

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Metabolismo de amitrol (3-amino-1,2,4-triazol) en
mamíferos : sobre su influencia en la biosíntesis de proteínas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Luis Franco Vera

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

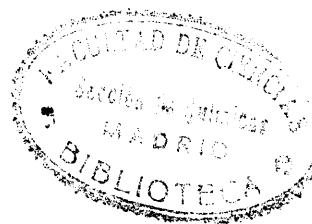
Serie A - n.º 143

BIBLIOTECA UCM



5300125358

SECCION DE QUIMICAS

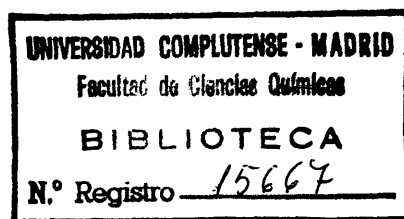


**METABOLISMO DE AMITROL (3-AMINO-
1, 2, 4 - TRIAZOL) EN MAMIFEROS
SOBRE SU INFLUENCIA EN LA BIOSINTESIS
DE PROTEINAS**

TESIS DOCTORAL

por

LUIS FRANCO VERA



Publicaciones de la Facultad de Ciencias

MADRID 1971



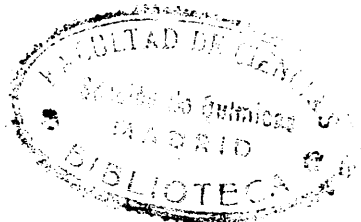


El presente trabajo se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Angel Martín Municio. A él va dirigido, en primer lugar, mi agradecimiento por sus valiosos consejos y enseñanzas, que han supuesto mucho más que la simple realización de este trabajo.

Deseo también manifestar mi gratitud a todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica por el apoyo que siempre he encontrado en ellos.

Finalmente, me es muy grato hacer constar mi agradecimiento al Patronato Juan de la Cierva del C.S.I.C. y a la Fundación Juan March por la ayuda económica prestada.

Madrid, Enero de 1971



INDICE

	<u>Página</u>
<u>1. PARTE TEORICA</u>	
1.1. INTRODUCCION	1
1.2. METABOLISMO DEL AMITROL EN VEGETALES	2
1.2.1. Influencia del amitrol sobre la biosíntesis de porfi- rinas.....	6
1.2.2. Quelatos del amitrol con metales	7
1.2.3. Influencia del amitrol en el metabolismo de hidratos de carbono	7
1.2.4. Influencia del amitrol sobre el metabolismo de bases nitrogenadas y de histidina	11
1.2.5. Influencia del amitrol sobre la biosíntesis de áci- dos nucleicos	13
1.2.6. Influencia del amitrol sobre el metabolismo de ami- noácidos y proteínas	14
1.3. EFECTOS DEL AMITROL SOBRE MAMIFEROS	15
1.3.1. Toxicidad y patogenicidad del amitrol	15
1.3.2. Metabolismo del amitrol en mamíferos. Direcciones de trabajo	15
1.4. BIOSINTESIS DE PROTEINAS	16
1.4.1. Introducción	16
1.4.2. Localización intracelular de la biosíntesis de pro- teínas	17
1.4.3. Ribosomas	18
1.4.3.1. Estructura de los ribosomas	18
1.4.3.2. Presencia de los ribosomas	22
1.4.4. Biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares.....	24
1.4.5. Mecanismo de la biosíntesis. Activación de aminoáci- dos	25
1.4.5.1. Aminoácido: tRNA ligasas (AMP) (Aminoacil-sRNA sintetasas)	27
1.4.5.2. RNA de transferencia	30

	<u>Página</u>
1.4.5.3. Especificidad de la aminoacilación de tRNA	35
1.4.6. RNA mensajero	37
1.4.6.1. Caracterización del mRNA	38
1.4.6.2. Biosíntesis del mRNA	39
1.4.6.3. Unión del mRNA al ribosoma	39
1.4.6.4. Degradación del mRNA	40
1.4.7. Formación del enlace peptídico	42
1.4.7.1. Transferencia de los aminoacil-tRNA al complejo ribosoma-mRNA	43
1.4.7.2. Factores enzimáticos requeridos para la polimeri- zación de aminoácidos	44
1.4.7.3. Naturaleza de las interacciones tRNA-ribosoma ..	44
1.4.7.4. Crecimiento de la cadena polipeptídica	45
1.4.8. El código genético	47
1.4.9. Iniciación y terminación de la traducción	51
1.4.9.1. Dirección de la traducción	51
1.4.9.2. Iniciación de la biosíntesis de proteínas	52
1.4.9.3. Terminación de la cadena polipeptídica	53
1.4.10. Universalidad del mecanismo propuesto	55
1.4.11. Regulación de la biosíntesis de proteínas	55
1.4.11.1. Genes reguladores	56
1.4.11.2. Regulación a nivel de tRNA	59
1.4.11.3. Regulación de la biosíntesis de proteínas en mamíferos	60
1.4.12. Inhibición de la biosíntesis de proteínas	62
1.4.12.1. Inhibidores que afectan al crecimiento de la cadena polipeptídica	62
1.4.12.2. Antibióticos que inhiben la función del ribo- soma	63
1.4.12.3. Inhibidores de acción no localizada	65
1.4.12.4. Inhibición de la biosíntesis de proteínas por sustancias con actividad fitotóxica	65
 <u>2. PARTE EXPERIMENTAL</u>	
2.1. BIOSINTESIS IN VITRO DE PROTEINAS	67
2.1.1. Valoración de proteínas solubles	67
2.1.2. Preparación de un sistema acelular de hígado de co- baya	69
2.1.2.1. Obtención de ribosomas	69
2.1.2.2. Fracción enzimática "pH 5"	70
2.1.2.3. Incubación y medida de la radiactividad	71
2.1.3. Preparación de un sistema acelular de corteza de ce- rebro de conejo	72

	<u>Página</u>
2.1.3.1. Fracción "microsomal"	72
2.1.3.2. Fracción enzimática "pH 5"	72
2.1.3.3. Incubación y medida de la radiactividad	72
2.1.4. Preparación de un sistema acelular de reticulocitos.	73
2.1.4.1. Tratamiento previo de los animales	73
2.1.4.2. Obtención de ribosomas	73
2.1.4.3. Obtención de enzimas AS ₇₀	74
2.1.4.4. Obtención de tRNA	74
2.1.4.5. Incubación y medida de radiactividad	75
2.1.5. Ensayo de actividad de las aminoácido-tRNA ligasas .	75
2.1.5.1. Preparación de ATP- γ - ³² P	75
2.1.5.2. Intercambio ATP-PP	77
2.2. BIOSINTESIS IN VIVO DE PROTEINAS	78
2.2.1. Tratamiento previo de los animales	78
2.2.2. Incorporación de aminoácidos - ¹⁴ C in vivo -	78
2.2.3. Valoración simultánea de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos en hígado	79
2.2.3.1. Separación selectiva	79
2.2.3.2. Valoración de proteínas	80
2.2.3.3. Valoración de RNA	80
2.2.3.4. Valoración de DNA	81
2.2.3.5. Valoración de lípidos totales	81
2.2.4. Valoración de aminoácidos	81
2.2.4.1. Preparación de las muestras	81
2.2.4.2. Valoración de aminoácidos totales	82
2.2.5. Análisis de proteínas	83
2.2.6. Análisis cuantitativo de aminoácidos libres	84
2.2.6.1. Preparación de las muestras	84
2.2.6.2. Análisis automático de aminoácidos libres	85
2.2.7. Electroforesis de proteínas de suero	86
2.2.7.1. Electroforesis en gel de acetato de celulosa ...	86
2.2.7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	86
2.3. ESTUDIO DEL METABOLISMO DE CLICOCOLA EN PRESENCIA DE AMITROL	88
2.3.1. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales .	88
2.3.1.1. Incubaciones con homogeneizados de hígado de co- baya	88
2.3.1.2. Incubación con homogeneizados de hígado de rata.	91
2.3.2. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales de animales tratados con amitrol	92
2.3.3. Experiencias con preparados enzimáticos purificados.	92

	<u>Página</u>
2.3.3.1. Aislamiento de L-serina: tetrahidrofólico-5,10-hidroxi- metiltransferasa	92
2.3.3.2. Síntesis enzimática de serina	93
2.4. TECNICAS DE ESTUDIO DEL METABOLISMO DE AMITROL	94
2.4.1. Investigación de metabolitos de amitrol	94
2.4.1.1. Procedimientos cromatográficos	94
2.4.1.2. Valoraciones de amitrol	95
2.4.1.3. Cromatografía automática de cambio de ion de de- rivados de amitrol	96
2.4.1.4. Análisis de la orina de los animales tratados ..	96
2.4.1.5. Análisis de muestras de tejidos de animales tra- tados	96
2.4.1.6. Estudio del metabolismo del amitrol "in vitro" .	97
2.4.2. Obtención de metabolitos de amitrol	97
2.4.2.1. Derivados de amitrol en vegetales	97
2.4.2.2. Derivados de amitrol en microorganismos	99
2.4.3. Espectroscopía infrarroja de derivados de amitrol ..	100
2.4.3.1. Obtención de espectros	100
2.4.3.2. Síntesis de 1-acetilamitrol y 3-acetilamitrol ..	101
2.5. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD Y PATOGENICIDAD DEL AMITROL	101
2.5.1. Análisis de sangre	101
2.5.2. Estudio microscópico de tejidos	101
<u>3. RESULTADOS Y DISCUSION</u>	103
3.1. BIOSINTESIS DE PROTEINAS EN SISTEMAS ACELULARES	104
3.1.1. Determinación de actividad de aminoácido: tRNA li- gasas	104
3.1.1.1. Preparación de ATP- γ - ³² P	104
3.1.1.2. Puesta a punto del método	107
3.1.1.3. Crítica del método	112
3.1.2. Sistema acelular de hígado de cobaya	113
3.1.2.1. Biosíntesis total de proteínas	113
3.1.2.2. Activación de aminoácidos	115
3.1.2.3. Discusión	118
3.1.3. Sistema acelular de corteza de cerebro de conejo ...	119
3.1.3.1. Biosíntesis total de proteínas	119
3.1.3.2. Activación de aminoácidos	120
3.1.3.3. Discusión	121
3.1.4. Sistema acelular de reticulocitos de conejo	122
3.1.4.1. Preparación de enzimas y tRNA	122
3.1.4.2. Biosíntesis total de proteínas	124

	<u>Página</u>
3.1.5. Discusión general de las experiencias de biosíntesis en sistemas acelulares	126
3.2. BIOSINTESIS DE PROTEINAS "IN VIVO"	127
3.2.1. Incorporación de leucina - 1 - ¹⁴ C	127
3.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE BIOSINTESIS DE PROTEINAS	128
3.4. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON AMITROL SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS, ACIDOS NUCLEICOS, LIPIDOS Y AMINOACIDOS LIBRES	130
3.4.1. Tratamiento de ratas con amitrol	130
3.4.1.1. Primera serie de tratamientos	130
3.4.1.2. Segunda serie de tratamientos	131
3.4.1.3. Tercera serie de tratamientos	134
3.4.1.4. Cuarta serie de tratamientos	134
3.4.1.5. Discusión	134
3.4.2. Valoración de proteínas	136
3.4.2.1. Resultados experimentales	136
3.4.2.2. Discusión	138
3.4.3. Valoración de RNA	138
3.4.3.1. Resultados experimentales	138
3.4.3.2. Discusión	139
3.4.4. Valoración de DNA	141
3.4.4.1. Resultados experimentales	141
3.4.4.2. Discusión	143
3.4.5. Valoración de lípidos	145
3.4.5.1. Resultados experimentales	145
3.4.5.2. Discusión	146
3.4.6. Valoración de aminoácidos libres	147
3.4.7. Interpretación de conjunto de las valoraciones realizadas	148
3.4.7.1. Tratamientos de duración media	148
3.4.7.2. Tratamientos de larga duración	150
3.5. ANALISIS DE PROTEINAS	150
3.5.1. Composición de proteínas	150
3.5.1.1. Composición de proteínas hepáticas	150
3.5.1.2. Composición de proteínas de suero	158
3.5.2. Análisis electroforético de proteínas de suero	160
3.5.3. Discusión	163
3.6. ANALISIS DE AMINOACIDOS LIBRES	164
3.6.1. Aminoácidos libres en hígado	164

	<u>Página</u>
3.6.2. Aminoácidos libres en suero	168
3.6.3. Discusión	168
3.7. INFLUENCIA DEL AMITROL SOBRE EL METABOLISMO DE GLICOCOLA	169
3.7.1. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales .	169
3.7.1.1. Incubaciones con homogeneizados de hígado de co- baya.....	169
3.7.1.2. Incubación con homogeneizado de hígado de rata .	175
3.7.1.3. Discusión	175
3.7.2. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales de hígado de animales tratados.....	176
3.7.3. Experiencias con preparados enzimáticos purificados.	176
3.8. ESTUDIO DEL METABOLISMO DE AMITROL	178
3.8.1. Obtención de derivados de amitrol en vegetales y mi- croorganismos	178
3.8.1.1. Derivados del metabolismo de amitrol en vegeta- les	178
3.8.1.2. Estudio particular de la amitrolilalanina	185
3.8.1.3. Derivados del metabolismo de amitrol en microor- ganismos	194
3.8.2. Metabolismo de amitrol en mamíferos	196
3.8.2.1. Puesta a punto de técnicas de valoración de ami- trol	196
3.8.2.2. Estudio de la eliminación de amitrol	196
3.8.2.3. Investigación de derivados de amitrol en anima- les tratados	198
3.8.2.4. Metabolismo del amitrol "in vitro"	201
3.8.3. Discusión de los estudios de metabolismo de amitrol.	203
<u>4. CONCLUSIONES</u>	204
<u>5. BIBLIOGRAFIA</u>	209

1. PARTE TEORICA

1.1. INTRODUCCION

Una de las mayores contribuciones de la Química a la Agricultura ha sido la introducción de sustancias con actividad fitotóxica. Su utilización está hoy día considerablemente extendida, pudiéndose citar, entre otras, las siguientes aplicaciones:

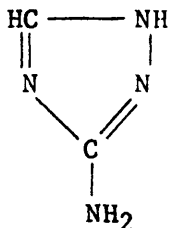
- a) Como herbicidas selectivos, contra plantas perjudiciales para cultivos.
- b) Como defoliantes en épocas de recolección.
- c) Como herbicidas contra plantas que crecen en zonas industriales, vías de comunicación, etc.
- d) Para eliminar arbustos de pastizales.
- e) Para control de especies en explotaciones forestales.

Hasta hace relativamente poco tiempo el uso de sustancias fitotóxicas descansaba sobre bases puramente empíricas. Actualmente, por el contrario, son cada vez más numerosas las investigaciones realizadas para estudiar el metabolismo de los inhibidores del crecimiento vegetal y el mecanismo íntimo de su acción fitotóxica. De esta forma la síntesis de nuevas estructuras -más activas o dotadas de una mayor selectividad- se puede encauzar por una vía más rigurosa.

Queda, no obstante, una materia que ordinariamente recibe menos atención. Es el estudio de los efectos de los herbicidas o sus metabolitos sobre los animales superiores. Aunque, naturalmente, se tienen datos sobre la toxicidad para mamíferos de casi todas las sustancias utilizadas en la regulación del crecimiento vegetal, son pocos los referentes a las posibilidades de su acción concreta sobre el metabolismo animal. La investigación en este terreno tiene así un interés superior al puramente especulativo, al descubrir los riesgos exactos que pueden derivarse del empleo de tales herbicidas.

Uno de los inhibidores del crecimiento vegetal más utilizado es el

amitrol (3-amino-1,2,4-triazol).



Aunque fue sintetizado al final del siglo pasado por Curtius y Lang y se estudiaron algunas de sus propiedades químicas (1), su fitotoxicidad no se observó hasta 1954 (2). Inicialmente se empleó como defoliante del algodón pero poco más tarde se descubrió su toxicidad frente a diversas hierbas perjudiciales para cultivos (3).

Son muy numerosos los estudios publicados acerca de su modo de acción y posibilidades de aplicación. Dejando de lado estos últimos -de escaso interés en el campo de la Bioquímica- se revisarán a continuación, del modo más completo posible, los datos que existen sobre la transformación del amitrol en vegetales y sus interferencias con el metabolismo de hidra^{tos} de carbono, porfirinas, aminoácidos, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos y proteínas. La consideración de todos ellos, junto con las escasas referencias actuales sobre la acción de este herbicida en animales superiores, llevará a justificar el estudio de la influencia del amitrol sobre la biosíntesis de proteínas en mamíferos, objeto central de esta investigación.

1.2. METABOLISMO DEL AMITROL EN VEGETALES

El amitrol aplicado en el suelo se absorbe por las raíces (2) y se traslada a las hojas, desde donde es redistribuido por los vasos liberia^{nos} (4,5) de la misma forma que el amitrol aplicado tópicamente. Los ensa^{yos} previos realizados con amitrol-5-¹⁴C demostraron que la actividad se acumula preferentemente en los meristemos o tejidos jóvenes (6,7) siendo escasa la presente en los tejidos ya maduros en el momento de la aplica^{ción} del herbicida (4). A la luz de los experimentos de Carter y Naylor (8) se ha podido constatar, no obstante, la no presencia del amitrol en los tejidos meristemáticos. La actividad hallada en ellos se debe, pues, a metabolitos que conservan, al menos en parte, el anillo de triazol. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que el amitrol, previamente

a su translocación vía floema, debe convertirse en un derivado que permita el transporte activo (9).

Son muy numerosos los datos que existen en la bibliografía sobre compuestos metabólicamente derivados del amitrol. Racusen (7) fue el primero que describió la presencia de dos metabolitos, X e Y, en plantas tratadas con el herbicida. Los dos dan reacción positiva con el ácido 8-amino-1-naftol-3,6-disulfónico (reactivo "H") que es específico de aminotriazoles. Además, el compuesto X produce coloración purpúrea con ninhidrina. Yost y Williams encontraron también un derivado del amitrol capaz de dar reacción positiva con ninhidrina (10).

En 1959 Massini (11) detectó un derivado del amitrol, ATX, en las plantas que, después de tratadas con el herbicida en concentraciones no letales, continuaban creciendo en presencia de la luz. Pudo aislarlo y describir algunas de sus propiedades físicas y químicas que le permitieron establecer su estructura como un α -aminoácido que conservaba el núcleo de aminotriazol. Poco más tarde Carter y Naylor (8,12) encontraron también dos metabolitos, I y II, que dieron reacción positiva con el reactivo "H". Herret y Linck (9) describieron otros dos que igualmente denominaron I y II y Miller y Hall llegaron a idénticos resultados, llamando X e Y a sus derivados (13).

El compuesto I de Carter y Naylor da reacción positiva con ninhidrina y se origina a partir de amitrol por un lado y serina por otro (14). Hilton (15), comparando todos estos resultados, llegó a establecer, en 1963, la identidad del ATX de Massini con el compuesto I de Carter y Naylor, el X de Racusen y de Miller y Hall, el II de Herret y Linck y el descrito por Yost y Col. Este mismo año Massini (16) consiguió identificar este metabolito como β -(3-amino-1,2,4-triazol-1-il)- α -alanina.

No obstante, no puede admitirse, sin ciertas reservas, la identidad establecida por Hilton. Las reacciones coloreadas de los derivados citados coinciden con una única diferencia en lo que respecta al comportamiento del ATX de Massini y el compuesto I de Carter y Naylor frente a la reacción del nitroprusiato (Tabla I), pero no puede decirse lo mismo sobre los datos cromatográficos. En la tabla II se recogen los R_{AT} (distancia recorrida por el metabolito/distancia recorrida por el amitrol) de los metabolitos descritos en distintos sistemas de disolventes.

A la luz de estos datos, publicados en su mayor parte después de la

TABLA I

REACCIONES COLOREADAS PRODUCIDAS POR LOS METABOLITOS
DEL AMITROL CON DIFERENTES REACTIVOS

<u>Reactivo</u>	<u>M E T A B O L I T O</u>			
	<u>ATX</u> <u>(Massini)</u>	<u>X</u> <u>(Racusen)</u>	<u>I</u> <u>(Carter-Naylor)</u>	<u>II</u> <u>(Herrett-Linck)</u>
Ninhidrina	púrpura	púrpura	azul-verdoso	azul-verdoso
"H"	rojo	rojo-naranja	rojo	rojo
Nitroprusiato (a)	n.r.v. (*)		verde	
Fenol-HCl (b)		amarillo	amarillo	
Ehrlich	amarillo	amarillo	amarillo	

a) K. A. Sund; J. Agr. Food Chem., 4, 57 (1956).

b) F. D. Aldrich y S.R. McLane; Plant Physiol., 32, 153 (1957).

(*) n.r.v. = no hay reacción visible.

revisión de Hilton, parece confirmarse la identidad del ATX con el X de Miller y Hall, el compuesto I de Carter y Naylor y el II de Herrett y Linck, pero pueden existir dudas respecto a la naturaleza del compuesto X de Racusen.

El otro derivado - aún no identificado - capaz de reaccionar con el reactivo "H" parece ser común a todas las especies estudiadas. Al menos se ha demostrado la identidad entre el metabolito Y de Miller y Hall, el compuesto Y de Racusen y el I de Herrett y Linck (17).

Las proporciones relativas de ambos derivados varían, sin embargo, con la especie vegetal tratada con el herbicida. Así, la amitrolilalanina es el metabolito más abundante en alubias (*Phaseolus vulgaris*) (7), mientras que en el algodón (*Gossypium* sp.) es el presente en menos proporción (13).

La formación de estos derivados no parece ser el motivo de la toxicidad del amitrol. La primera prueba, aunque incompleta, a este respecto deriva del hecho de que el 3-hidroxi-1,2,4-triazol, compuesto no perjudicial para los vegetales, sufre en ellos transformaciones semejantes a las del amitrol (18). Posteriormente se ha demostrado, de modo inequívoco, que ninguno de los dos derivados mencionados es tóxico para las plantas (7,8,

TABLA II

R_{AT} X 100 DE ALGUNOS METABOLITOS DEL AMITROL
EN DISTINTOS SISTEMAS DE DESOLVENTES

Metabolito	<u>D I S O L V E N T E</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
X (Racusen)	30	29	47	33	73							
X (Miller-Hall)	51								12	42	24	23
I (Carter y Naylor)					35	68						
II (Herrett y Linck)			75					12				
ATX (Massini)	39	55	75	20	76	42	76	9	14	31	33	21

- 1: Metanol-ác. fórmico-agua 80:15:5
- 2: Butanol-ác. acético-agua 27:7:17
- 3: Isopropanol-amoníaco-agua 6:2:2
- 4: Piridina-agua 8:2
- 5: Fenol-agua 8:2
- 6: Butanol-ác. propiónico-agua 20:10:14
- 7: Fenol-agua 72:28
- 8: Butanol-etanol-agua 52.5:32:15.5
- 9: Butanol-etanol-agua 1:4:1
- 10: Propanol-acetato de etilo-agua 6:1:3
- 11: Butanol-ác. acético-agua 4:1:5 (capa superior)
- 12: Isopropanol-amoníaco-agua 80:5:15

16). Es más, la formación de amitrolilalanina parece interpretarse como una vía de desintoxicación para los vegetales tratados (14).

Si bien los dos metabolitos mencionados son los más frecuentemente descritos en la bibliografía a causa de la facilidad de su detección por reacciones coloreadas no son los únicos productos de la transformación del amitrol. Carter y Naylor (8) al tratar vegetales con amitrol 5-¹⁴C en contraron once productos activos además de los indicados. Uno de ellos, descrito anteriormente por Rogers (19) fue estudiado por Fredrick y Genti le que lo hallaron en todas las especies vegetales tratadas con el herbicida. Sus investigaciones preliminares permitieron caracterizarlo como un glucósido de amitrol (20, 21). Poco más tarde comprobaron que el compuesto no era capaz de diazotarse ni reducía a los reactivos de Fehling y Tollen. Estos datos, junto con las evidencias obtenidas por espectroscopía infrarroja les permitieron identificar el derivado como N-(1-H-1,2,4-triazol-3-il)-D-glucopiranosilamina (22). También se han obtenido pruebas acerca de la no toxicidad de este glucósido (17) que parece jugar un papel importante en el transporte del herbicida (23). Más adelante se discutirán las implicaciones que supone su formación en el metabolismo de hidratos de carbono.

Finalmente, conviene hacer mención de los estudios realizados sobre otro derivado del metabolismo del amitrol en vegetales cuya identificación no se ha conseguido aún. Se trata del compuesto III de Herrett (17) que rinde amitrol por hidrólisis en condiciones muy suaves y que es 5-7 veces más tóxico que el propio herbicida.

1.2.1. Influencia del amitrol sobre la biosíntesis de porfirinas.

El primer síntoma tóxico observado en las plantas tratadas con amitrol es la clorosis de las hojas crecidas después de su aplicación (2,24). Se ha visto, incluso, que si se tratan plantas de maíz durante la maduración de la mazorca las semillas que se forman dan origen a plántulas cloróticas (25).

El amitrol inhibe la catalasa, tanto en vegetales como en animales, in vitro e in vivo (26, 27, 28). Pero la inhibición in vivo es irreversible y tiene lugar con concentraciones del herbicida que ejercen poca o ninguna influencia in vitro (29-33). Este hecho condujo a la hipótesis de que el amitrol, debido a su relativa semejanza estructural con el pirrol po-

día inhibir la síntesis de porfirinas. En esta misma dirección parecía apuntar el trabajo de Auerbach y col. (34) que encontraron que el amitrol inhibía la L-triptófano: oxígeno oxidoreductasa, (EC 1.13.1.12) otra enzima con grupo prostético porfirínico. Así pues, durante algún tiempo se pensó que la clorosis sería consecuencia de la inhibición de la formación de clorofila como caso particular de la interferencia con la biosíntesis de porfirinas. Algunos hechos, sin embargo, se oponían a esta hipótesis previa. Tal es el caso de la observación por parte de Heim y col. (30) de que el amitrol no inhibe la formación de todos los compuestos porfirínicos. La hipótesis cedió definitivamente al demostrarse que el herbicida no inhibe la biosíntesis de porfirinas tanto a partir de porfobilinógeno (35, 36) como de glicocola (19).

Actualmente se admite que la inhibición de la síntesis de clorofila es un efecto secundario a la destrucción de cloroplastos que provoca el amitrol (37, 38).

La aparición de clorosis en las plantas tratadas puede, desde luego, contribuir a la acción fitotóxica, pero no es la única causa responsable de la inhibición del crecimiento. En efecto, esta inhibición se produce también cuando el vegetal crece en la oscuridad, es decir, en ausencia de fotosíntesis (39-42). En el mismo sentido puede hacerse referencia a la inhibición del desarrollo de raíces (43).

1.2.2 Quelatos del amitrol con metales.

Se ha descrito la formación de quelatos del amitrol con varios metales, como cobre, hierro, níquel, manganeso y magnesio (33, 44, 45, 46). El más estudiado es quizá el de hierro, que se forma fácilmente tanto in vitro como in vivo. Es un quelato trivalente en cuyos enlaces participa el nitrógeno del grupo amino primario y el que ocupa la posición 2 del ciclo de triazol (47, 48). No existen, sin embargo, pruebas de que la formación de quelatos esté implicada en la acción fitotóxica del herbicida. (49).

1.2.3. Influencia del amitrol en el metabolismo de hidratos de carbono.

Anteriormente se ha mencionado la presencia de un glucósido de amitrol (GAT) en las plantas tratadas con el herbicida. Su formación se lleva a cabo mediante una reacción no enzimática entre el amitrol y la glucosa o, mejor aún, la glucosa-1-fosfato (50), lo que debe suponer un consu-

mo de sustratos para la síntesis de oligo y polisacáridos, ya que el glucósido de amitrol es bastante estable. Naylor (51) describe la escasa incorporación de glucosa-1-¹⁴C en sacarosa en tejidos de plantas tratadas con el herbicida, hecho que parece estar de acuerdo con la hipótesis anterior.

Por otra parte, el amitrol inhibe la α -1,4-glucan - ortofosfato glucosil transferasa (EV 2.4.1.1) (47). Pero la inhibición no se debe, a la formación de un quelato con manganeso, catión esencial para la enzima, como se creyó en un principio (48, 52), sino a una competición del derivado fosforilado del GAT con el AMP en la biosíntesis de la forma activa de la transferasa (53, 54). La inhibición de esta enzima implica, entre otros efectos, el bloqueo de la degradación de polisacáridos, al no tener lugar la necesaria fosforilación previa (55). Quizá este hecho dé cuenta, al menos en parte, de la mayor concentración de hidratos de carbono presente en plantas tratadas con amitrol con respecto a plantas normales (56, 57), y de la gran cantidad de almidón encontrada en el alga *Scenedesmus quadricauda* cultivada en presencia del herbicida (58).

Como acaba de quedar apuntado más arriba el GAT puede fosforilarse mediante la acción de una hexoquinasa en presencia de ATP (20, 59), pero la reacción transcurre a una velocidad menor (aproximadamente la mitad) que la fosforilación normal de la glucosa (20). Este motivo, junto con la inhibición de la α -1,4-glucan-ortofosfato glucosil transferasa, hace que el catabolismo de hidratos de carbono en plantas tratadas con amitrol sea más lento de lo normal (56, 60).

El derivado fosforilado del GAT (PGAT) puede escindirse por acción de una aldolasa (61). Fredrick y Gentile han estudiado y caracterizado los productos de esta escisión, observando que por una parte se obtiene fosfodihidroxiacetona y por otra un fragmento de tres carbonos unido a una molécula de amitrol. Su estructura, como se ha comprobado por espectroscopía infrarroja, corresponde a una aminotriazoliltriosa (62).

En la figura 1 se esquematiza la interferencia producida por el amitrol en la glicolisis. Así pues, mientras la glicolisis normal conduce a dos triosas a partir de una hexosa, en presencia de amitrol sólo una triosa - la fosfodihidroxiacetona - se encuentra en condiciones de continuar la secuencia metabólica correspondiente. De esta forma puede explicarse también el hecho de que los tejidos vegetales cloróticos inducidos por el

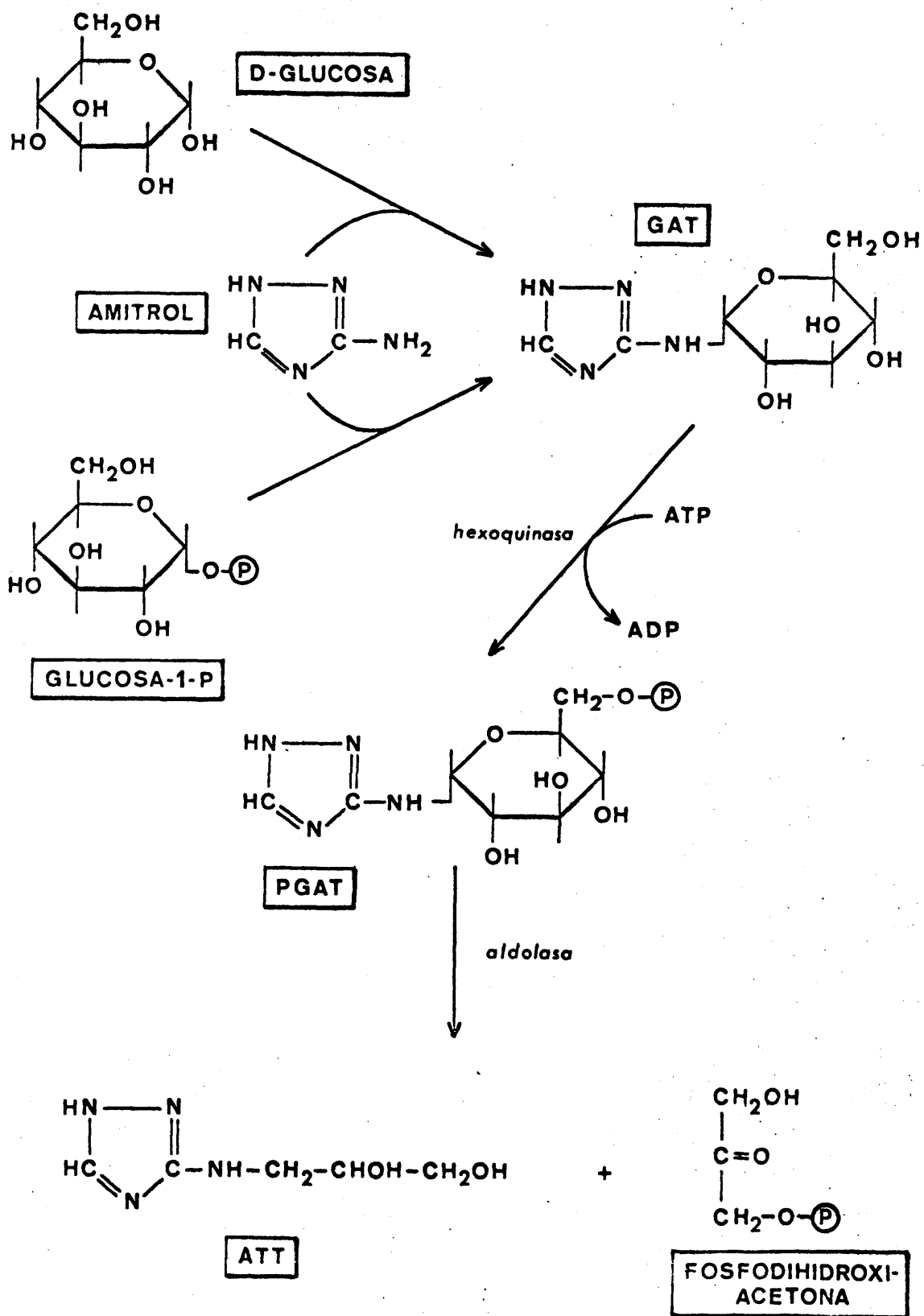


Figura 1

tratamiento con amitrol utilicen más lípidos que hidratos de carbono como sustratos de la cadena respiratoria (56), ya que la glicolisis se halla profundamente alterada.

Los efectos del amitrol sobre el metabolismo de hidratos de carbono son, pues, considerables y pueden, de acuerdo con Fredrick y Gentile (55), explicar - al menos en parte - la acción fitotóxica de este herbicida.

Recientemente, estos autores han postulado que la aminotriazoliltriosa (ATT) formada por escisión enzimática del PGAT es el producto final del metabolismo del amitrol. Es más, no admiten la existencia de la amitrolilalanina como derivado del amitrol e identifican el ATX de Massini con su ATT (62). La reacción positiva del ATX con ninhidrina va, naturalmente, en contra de esta hipótesis, pero la atribuyen a la presencia de aminoácidos coprecipitados con la ATT. De hecho, Fredrick y Gentile han observado también reacción positiva con ninhidrina en preparados brutos de ATT, pero la reacción desaparece al purificar el metabolito.

No obstante, estos datos no implican que los derivados hayan de ser idénticos. En primer lugar, ni el material biológico de partida ni el procedimiento de obtención utilizado por Fredrick y Gentile para la ATT son totalmente idénticos a los de Massini. Por otra parte, la reacción positiva del ATX con el reactivo "H" - ya transcurre mediante una previa diazotación implica la existencia de una amina primaria aromática que no se encuentra en la ATT ni en ningún supuesto aminoácido coprecipitado con ella.

Pero los hechos experimentales que se oponen con más fuerza a la hipótesis de Fredrick y Gentile son los siguientes:

- a) El análisis cuantitativo elemental del ATX (11) arroja un resultado más compatible con una estructura de amitrolilalanina que de ATT (Tabla III).

TABLA III

ANALISIS ELEMENTAL DEL ATX DE MASSINI

	<u>C%</u>	<u>H%</u>	<u>N%</u>	<u>O%</u>
Encontrado para ATX	34.0	5.5	38.5	20.4
Teórico para AT-ala	35.0	5.2	40.8	18.7
Teórico para ATT	38.0	6.2	35.5	20.3

- b) Los valores de pK_a obtenidos por valoración del ATX ($pK_1 = 2.1$ y $pK_2 = 7.9$) (11) no concuerdan con los de aminoácido alguno.
- c) El ATX no se hidroliza ni en HCl 6 N ni en amoníaco concentrado a 100° . Por reducción con HI al 55% rinde α -alanina.
- d) El ATX - supuesta su identidad con el compuesto I de Carter y Naylor - aparece considerablemente marcado al tratar plantas con amitrol y serina o glicocola- ^{14}C , en condiciones tales que el metabolismo de la glucosa sólo se altera débilmente (14).
- e) Al tratar un cultivo de *Escherichia coli* con amitrol-5- ^{14}C se detecta una incorporación isotópica en las proteínas del microorganismo (63). La hidrólisis de estas proteínas rinde un único producto marcado, cuyo comportamiento cromatográfico coincide con el del ATX. Estos resultados son compatibles con la estructura propuesta por Massini, cuya semejanza con la histidina permitiría su incorporación en proteínas. En esta misma línea está el reciente descubrimiento de radiactividad en plantas tratadas con amitrol-5- ^{14}C (64).

Todos estos datos parecen contradecir la hipótesis de Fredrick y Gentile. La más plausible es, pues, que tanto amitrolilalanina como aminotriazoliltriosa se forman realmente como resultado del tratamiento con el herbicida.

1.2.4. Influencia del amitrol sobre el metabolismo de bases nitrogenadas y de histidina.

Desde hace algún tiempo se sabe que el amitrol inhibe el crecimiento de levaduras (65) y de bacterias (65, 66). La toxicidad se contrarresta en levaduras por adición de histidina (40,65) o de adenina, aunque con esta base la recuperación no es total (67). En bacterias es necesaria la presencia de una mezcla de adenina e histidina (66) para anular los efectos del amitrol.

La histidina (51, 68, 69) y la adenina (58, 70, 71, 72) pueden también anular, o al menos retardar, la inhibición del crecimiento de algas provocada por el amitrol. En el caso de *Prototheca zopfii*, especie apocóritica de la clorofíceas, la adenina no parece tener, sin embargo, ningún efecto (73).

Por el contrario, en plantas superiores la histidina es incapaz de

destruir la acción fitotóxica del amitrol (40, 51). El único efecto de este aminoácido es contrarrestar ligeramente la inhibición del crecimiento de pelos radicales provocada por el herbicida (74). Mayor eficacia tiene la adenina, aunque no llega a desaparecer la clorosis (75). Para que el crecimiento de un vegetal superior tratado con amitrol vuelva a un ritmo normal es necesaria la presencia de adenina, guanina, hipoxantina y xantina en cantidades equimoleculares (75, 76) o bien de riboflavina (77). Parece ser que este compuesto puede incluso restablecer la síntesis de clorofila en tejidos cloróticos (41, 75) aunque existen ciertas dudas a este respecto (51).

Todos estos datos parecen apuntar hacia una interferencia del amitrol con el metabolismo de histidina, riboflavina y bases púricas. Precizando más, puede apuntarse que en microorganismos y algas la interferencia con la histidina y bases púricas es paralela, mientras que en plantas superiores cobra mayor importancia el efecto sobre el metabolismo de bases nitrogenadas.

Ahora bien, desde 1955 se sabe que el núcleo de imidazol de la histidina proviene, al menos en las bacterias, del anillo pirimidínico de las purinas (78), por lo que, inicialmente, se tendió a unificar - desde el punto de vista de su origen - los efectos del amitrol sobre histidina y bases púricas. (65). La riboflavina, por otra parte, también deriva del metabolismo de la adenina (79) por lo que su acción sobre las plantas tratadas con el herbicida se interpretó asimismo como una consecuencia de la alteración del metabolismo de purinas (15).

Sin embargo, actualmente se admite que los efectos del amitrol sobre la formación de histidina no son sólo una consecuencia de los que ejerce sobre las bases púricas. En efecto, Klopotoski y Hulanicka (80), trabajando con dos cepas previamente estudiadas de *Saccaromyces cerevisiae* (81), observaron la acumulación de imidazolglicerofosfato en el medio de cultivo cuando éste se hacía en presencia de amitrol, lo que parecía indicar un bloqueo en la secuencia metabólica que conduce a la síntesis de histidina. En 1965 el grupo de Hilton, trabajando con dos especies de levaduras (82) y con una bacteria, *Salmonella typhimurium*, (83), estableció que el efecto del amitrol sobre el metabolismo de histidina se centra en la inhibición de la D-eritroimidazol-glicerofosfato hidro-*liasa* (EC 4.2.1.19). A idénticas conclusiones llegaron simultáneamente Klopotoski y

y Wiater (84) y, poco más tarde, Siegel y Gentile encontraron que el amitrol inhibe la misma enzima en dos especies de algas (69).

Esta interpretación de la influencia del amitrol sobre la biosíntesis de histidina permite una posibilidad de explicar el escaso efecto que el aminoácido ejerce en la recuperación de las plantas superiores tratadas con el herbicida. En efecto, el mecanismo de la biosíntesis de histidina en vegetales superiores no está aún aclarado. Es posible que no implique la actuación de la amidazolglicerofosfato hidro-*liasa*, lo que justificaría todos los datos reseñados. En apoyo de esta hipótesis está el hecho de que la cantidad de histidina libre en plantas no disminuye al ser tratadas con amitrol (85).

Por otra parte, el amitrol afecta también la síntesis de bases púricas (83). El herbicida bloquea el paso de 4-amino imidazol a formiimino-glicocola en bacterias (67, 86), lo que explica la necesaria presencia de esta base para anular su toxicidad.

1.2.5. Influencia del amitrol sobre la biosíntesis de ácidos nucleicos.

Dados los efectos del amitrol sobre la biosíntesis de bases nitrogenadas - discutidos en el apartado anterior -, cabría esperar una influencia del herbicida sobre la biosíntesis de ácidos nucleicos.

Así, se ha encontrado que en raíces de plantas de algodón tratadas con amitrol, el contenido de nucleótidos solubles es más bajo que en plantas normales (88). Este dato está de acuerdo con el bajo nivel de síntesis de purinas esperado en vegetales, aunque no ha podido ser confirmado en plantas jóvenes de trigo (89).

Por otra parte, el contenido de ácidos nucleicos en algas cultivadas en presencia de amitrol es inferior al nivel normal (90), mientras que en vegetales superiores sólo se altera el contenido de RNA (89). Esta carencia parcial de ácidos nucleicos no es sólo consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de bases púricas, ya que el amitrol perturba la normal incorporación en ácidos nucleicos de adenina- ^{14}C (82) y ácido orótico- ^{14}C (90). No está del todo claro el mecanismo de la inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos, aunque los resultados previos de Worth y Longham (91) parecen indicar que el amitrol impide la fosforilación normal de los nucleósidos.

1.2.6. Influencia del amitrol sobre el metabolismo de aminoácidos y proteínas.

En un apartado anterior se han discutido los efectos del amitrol sobre la biosíntesis de histidina en microorganismos. En vegetales superiores, en los que la síntesis de histidina no parece afectarse por el herbicida, el amitrol altera el contenido de aminoácidos alifáticos.

En primer lugar, en plantas tratadas hay más aminoácidos libres que en las de control (89), resultado concordante con el hallado en algas (92). Pero, además hay diferencias cualitativas entre ciertos aminoácidos individuales. Lo más notable es que, tanto la glicocola como la serina desaparecen de las plantas entre los doce y los dieciseis días siguientes a la aplicación del herbicida (85), hecho que puede justificarse por el consumo de estos aminoácidos para la formación de amitrolilalanina. En efecto, si la planta crece en la oscuridad no se forma amitrolilalanina (11) y el contenido de glicocola y serina es prácticamente normal (85).

Se ha apuntado ya que la síntesis de amitrolilalanina puede interpretarse como un proceso de desintoxicación; ahora bien, si su formación supone el consumo total de glicocola y serina puede aparecer un efecto tóxico secundario para la planta. Las consecuencias de esta toxicidad secundaria no están aún demostradas.

Finalmente, es necesario mencionar que tanto el ácido aspártico como su amida aumentan notablemente su proporción como efecto del tratamiento con el herbicida.

Dada la influencia del amitrol sobre la biosíntesis de ácidos nucleicos y el contenido y metabolismo de aminoácidos, se ha dedicado cierta atención al estudio de sus efectos sobre la biosíntesis de proteínas en vegetales (93). Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que si bien in vitro no parece afectar a la incorporación normal de leucina-¹⁴C (94), el tratamiento in vivo con amitrol reduce la cantidad de proteínas, tanto en algas (92) como en vegetales superiores (89). Quizá el hecho más destacable es la baja proporción de glicocola presente en las proteínas de plantas tratadas en presencia de la luz (89).

1.3. EFECTOS DEL AMITROL SOBRE MAMÍFEROS

1.3.1. Toxicidad y patogenicidad del amitrol.

El amitrol es poco tóxico para los mamíferos. La DL_{50} oral es de 14.7 g/kg para ratones, y de 25 g/kg para ratas (95). La administración por vía parenteral, intraperitoneal o subcutánea tampoco desencadena efectos tóxicos importantes, siendo las DL_{50} de 1.7, 1.6 y 1.2 g/kg para gatos, ratones y perros, respectivamente (97).

Aunque la supervivencia de los animales tratados con una sola dosis de amitrol es elevada, su administración crónica produce una serie de efectos que es necesario tener en cuenta. En primer lugar, se aprecia una pérdida de peso en conejos y cobayas, y más ligera en ratas y ratones (98). La catalasa de mamíferos se inhibe también como consecuencia del tratamiento con amitrol. La inhibición, tanto en vivo como in vitro, se ha demostrado en hígado (99, 100) y en leucocitos (101).

Pero el efecto patológico más pronunciado del amitrol es su acción frente al tiroides. La administración del herbicida, tanto por vía oral como parenteral, inhibe la captura del yodo por la glándula (102, 103). Un tratamiento prolongado produce hiperplasia del tiroides (103), aunque no aparecen metástasis, ni siquiera al cabo de dos años de administración parenteral diaria de amitrol (100 ppm). Son necesarias dosis más elevadas para que los cuadros clínicos exhibidos por los animales puedan considerarse como indicativos de carcinoma (104, 105). Queda, sin embargo, sin explicar el hecho de que la administración del herbicida retarde la cancerización del hígado provocada por dimetilaminoazobenceno (99, 106).

Puede, pues, considerarse, de acuerdo con Oser (107), que el amitrol es un agente cancerígeno débil y secundario.

1.3.2. Metabolismo del amitrol en mamíferos. Direcciones de trabajo.

El amitrol-¹⁴C administrado a ratas por vía oral se metaboliza rápidamente en hígado y se elimina por la orina. En las veinticuatro horas siguientes al comienzo del tratamiento, el 70-95% de la radiactividad aparece en la orina, que contiene el amitrol inalterado y dos metabolitos. Estos dos derivados se pueden detectar también en otros tejidos aunque la transformación del amitrol en ellos tiene lugar a menor velocidad (108).

Dada la escasez de datos relativos a los efectos del amitrol en mamíferos se plantea la conveniencia de profundizar en ellos. Además del inte

rés que pueda tener el conocimiento más íntimo del metabolismo del amitrol en mamíferos, parece necesario estudiar de un modo sistemático su influencia en la biosíntesis de proteínas. Los datos actuales - reseñados en el apartado 1.2.6 - son a todas luces insuficientes y a veces contradictorios. Pero quizá la laguna más importante sea la falta de una investigación sistemática sobre la influencia del amitrol en la biosíntesis de proteínas y sobre los efectos globales que pueda producir en mamíferos. Estos son los dos campos que pretende cubrir la investigación presente. Se estudiará, pues, como tema central, la influencia del amitrol en la biosíntesis de proteínas en mamíferos, tanto "in vitro" como "in vivo" y este estudio se completará - siempre que sea necesario - con el de otros efectos adyacentes del amitrol.

Por este motivo, en la presente memoria se discutirán a continuación los fundamentos generales de la biosíntesis de proteínas, necesarios para la ulterior exposición de la investigación realizada.

1.4. BIOSINTESIS DE PROTEINAS

1.4.1. Introducción.

Uno de los temas más debatidos en la investigación bioquímica de los últimos diez años ha sido el de la biosíntesis de proteínas. Gracias al considerable número y profundidad de los estudios realizados, hoy día se conoce con bastante precisión el mecanismo por el cual los aminoácidos pueden unirse entre sí, formando enlaces peptídicos, para llegar a producir la gran variedad de moléculas proteicas del organismo.

Acaban de quedar apuntados los dos problemas que, ya desde el principio, llamaron la atención de los investigadores. El primero es el aspecto energético de la polimerización de aminoácidos. En efecto, la formación de enlaces peptídicos es endergónica, lo que supone - caso frecuente en las reacciones bioquímicas - la existencia de un mecanismo previo de activación de los aminoácidos.

El segundo, cuya complejidad se advirtió desde los primeros momentos, deriva de la necesidad de que los aminoácidos se unan entre sí, no al azar sino siguiendo un orden determinado, para conseguir una secuencia de uniones - estructura primaria - de la que derivan la configuración y disposición espacial de la cadena polipeptídica - estructuras secundaria y terciaria - y la actividad biológica de las proteínas.

La consecuencia es específica para cada proteína pero, además, cada proteína es específica del organismo a que pertenece. El mantenimiento de este doble aspecto de la especificidad y su conservación a lo largo de las sucesivas generaciones del ser vivo han hecho entrar al estudio de la biosíntesis de proteínas en íntima relación con la Genética, dando origen a la moderna Genética Molecular.

1.4.2. Localización intracelular de la biosíntesis de proteínas.

Dos hechos contribuyeron al progreso inicial de los estudios de biosíntesis de proteínas. Por una parte, el perfeccionamiento de las técnicas isotópicas permitió detectar con gran sensibilidad y relativa exactitud la síntesis "de novo" de proteínas a partir de aminoácidos isotópicamente marcados. Por otra, las técnicas de fraccionamiento de tejidos permitieron la precisa localización intracelular de los procesos que conducen a la formación de las proteínas.

Desde hace casi treinta años se sabe que la biosíntesis de proteínas está de algún modo asociada con el RNA citoplásmico (109, 110). Estas primeras observaciones histoquímicas se completaron, años más tarde, gracias al avance realizado en el aislamiento de partículas subcelulares. Así, pudo llegarse a establecer que en la síntesis de proteínas en mamíferos jugaba un importante papel la "fracción microsomal", es decir, el sedimento que resulta al centrifugar a 100.000 g durante una hora un homogeneizado del que previamente se han eliminado las fracciones nuclear y mitocondrial. (111-113).

La aplicación de la microscopía electrónica al estudio de la "fracción microsomal" puso de manifiesto que su composición no es morfológicamente homogénea, ya que está compuesta por fragmentos del retículo endoplásmico, tanto liso como rugoso (113). Los sistemas de membranas lisas no intervienen en la síntesis de proteínas (114), aunque sí juegan un importante papel en el transporte de las sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso. La comprobación de este hecho, debida a Peters (115), se apoya en que inmediatamente después de la inyección de leucina-¹⁴C se detecta incorporación isotópica en las proteínas del retículo endoplásmico rugoso de los animales, mientras que su presencia en las del liso sólo comienza a medida en que desaparece del primero.

Ahora bien, estructuralmente son idénticas las membranas lisas de las rugosas. La diferencia funcional se debe a la presencia en las segun-

das de un cierto número de partículas, los ribosomas, que, por estar unidos a la superficie de las membranas, les dan la apariencia que indujo a los citólogos a designarlas con el nombre con que aún hoy son conocidas.

Los ribosomas pueden separarse de las membranas a que están unidos por tratamiento con detergentes tales como el desoxicolato sódico. El grupo de Zamecnik fue capaz de demostrar, de esta forma, que la actividad de biosíntesis de proteínas está localizada precisamente en los ribosomas (112).

1.4.3. Ribosomas.

1.4.3.1. *Estructura de los ribosomas.*

Los ribosomas constituyen un tipo de partículas subcelulares presente prácticamente en todas las células vivas. Aunque su estructura y propiedades físicas varía ligeramente de unos organismos a otros, la uniformidad de los mismos se centra en varios aspectos que a continuación se discuten.

Los ribosomas aislados de organismos eucarióticos tienen un coeficiente de sedimentación próximo a 80 S. Son partículas aproximadamente esféricas cuyo peso es de unos $4 \cdot 10^6$ daltons. Los ribosomas de procariontes son algo menores, con un coeficiente de sedimentación de 70 S y un peso de $2.7 \cdot 10^6$ daltons.

Todos los ribosomas están formados por dos subunidades desiguales. La menor, con una masa aproximadamente igual a la tercera parte del ribosoma completo, tiene un coeficiente de sedimentación de 40 S en animales y plantas y de 30 S en bacterias, mientras que los valores correspondientes a la mayor son de 60 y 50 S respectivamente. La existencia de estas subunidades se dedujo a partir de datos obtenidos por ultracentrifugación pero Huxley y Zubay (116) consiguieron ponerla de manifiesto más tarde mediante observación al microscopio electrónico de ribosomas con tinción negativa.

El equilibrio entre el ribosoma completo y sus subunidades está controlado, al menos "in vitro", por la concentración de Mg^{2+} (117). En todos los casos la ausencia de este ión favorece la disociación, pero las concentraciones óptimas requeridas para la asociación varían según las especies (118, 119).

Todos los ribosomas están compuestos por RNA y proteínas en propor-

ciones variables según la procedencia de los mismos (120). La mayor parte de la proteína es estructural, pero se encuentran también determinadas enzimas. Quizá con la única excepción de los aislados de reticulocitos (121) todos los ribosomas, tanto de mamíferos (122) como de vegetales y bacterias (123), contienen ribonucleasa en proporción relativamente elevada. La enzima parece estar asociada con la subunidad menor, lo que hace que sea la más inestable del ribosoma (124). También se encuentra en los ribosomas actividades de fosfomonoesterasa (125), fosfodiesterasa (126), amilasa y otras enzimas.

En ocasiones es difícil, sin embargo, decidir si una enzima, cuya actividad se ha encontrado presente en preparados de ribosomas, es realmente constitutiva de ellos o, por el contrario, su presencia es sólo transitoria por ser los ribosomas las partículas activas en la síntesis de proteínas.

El RNA ribosomal (rRNA) puede aislarse de dichas partículas fácilmente por los métodos usuales, aunque el más adecuado sigue siendo la extracción con fenol (127). Sin embargo, la dificultad de eliminar la ribonucleasa a lo largo del proceso de extracción hizo difícil durante algún tiempo el aislamiento del rRNA intacto. Si la enzima se inactiva (por adición de bentonita, por ejemplo) el rRNA aislado de ribosomas completos puede separarse, por centrifugación de zona en gradiente, en dos componentes. Sus coeficientes de sedimentación son respectivamente de 23 y 16 S para ribosomas de bacterias y de 30 y 18 S para los de organismos superiores. En ambos casos el rRNA de mayor coeficiente de sedimentación corresponde a la subunidad mayor.

Aunque la separación puede realizarse también por cromatografía en columna de albúmina metilada-kieselguhr (128), la introducción reciente de los rotores zonales ha hecho de la ultracentrifugación zonal la técnica más adecuada para la obtención en gran escala de los distintos tipos de rRNA (129).

El análisis de bases revela sólo pequeñas diferencias en la composición de ambos RNAs (130) que, además, varía muy poco a lo largo de una amplia escala evolutiva (131).

La estructura secundaria del rRNA fue estudiada en primer lugar por Spirin que consiguió demostrar la presencia de una moderada complementación, análoga a la del DNA, que determina la disposición helicoidal de

ciertas regiones de la molécula (131).

Además de los dos componentes principales del rRNA se ha aislado otro de 5S a partir de la subunidad 60 S de ribosomas de levaduras (132). Se pensó en un principio que podría tratarse de fragmentos de degradación por nucleasas de los rRNAs mayores, pero su presencia en preparados en los que la actividad de estas enzimas se había inhibido totalmente confirmó la existencia del rRNA 5 S como una especie independiente de las anteriores. Posteriormente se han aislado de bacterias y de diversos tejidos de mamíferos. La aplicación de los rotores zonales ha permitido también en este caso aislar el rRNA 5 S en cantidad suficiente para determinar su secuencia (133). Se conocen totalmente las estructuras primarias del de *E. coli* (134) y el de células KB -un cultivo artificial de células de mamíferos- (135). Ambos constan de 120 nucleótidos de los que 35 ocupan la misma posición de ambos RNAs. Recientemente se ha descrito también la estructura primaria de un rRNA 5 S de levaduras. (136). A pesar de estos datos, la función de estos RNAs no se conoce aún. Es uno de los pocos casos en los que el conocimiento de la estructura ha sido anterior en el tiempo al de su función.

El otro gran componente del ribosoma, la proteína, exhibe una complejidad mucho mayor que la del RNA. Las proteínas ribosomales, como cabe esperarse por su asociación al RNA, recuerdan a las histonas por su bajo peso molecular y su abundancia en aminoácidos básicos (137). Su estudio es difícil, ya que su aislamiento presenta ciertas complicaciones. Al separar el RNA tienden a agregarse y a precipitar (118), planteándose serios problemas en su solubilización (138).

Waller y Harris (139) fueron los primeros que demostraron la heterogeneidad de la proteína ribosomal. Una preparación cruda de proteínas de ribosomas de *E. coli* se puede separar en dos fracciones por cromatografía en columna de carboximetilcelulosa, pero por electroforesis en gel de almidón se logra un ulterior fraccionamiento, obteniéndose entre 17 y 20 bandas de movilidad muy positiva como corresponde a su carácter básico. En presencia de urea 6-8 M se puede obtener una resolución aún mayor apareciendo más de 20 bandas (140). Los mismos resultados se consiguen por electroforesis en gel de poliacrilamida (138, 141).

Aunque la composición de aminoácidos de las proteínas de las dos subunidades es muy semejante (142), los datos obtenidos por electroforesis

permiten concluir que las proteínas son diferentes (138, 140).

Admitiendo un peso de $1.7 \cdot 10^6$ daltons para la totalidad de rRNA (130) y un peso molecular de 25.000 para las proteínas ribosomales (118), pueden existir unas 40 moléculas de proteína en un ribosoma de 70 S, de las que 26 corresponderían a la subunidad mayor y 14 a la menor. Es posible que esas 40 proteínas sean todas distintas, aunque no se ha obtenido aún, ni por electroforesis ni por ninguna otra técnica, una total evidencia de ello.

Se han observado diferencias de movilidad entre las proteínas ribosomales de distintas especies del género *Bacillus* (140) e incluso entre las de dos cepas distintas de *E. coli* (143), lo que plantea con más fuerza un problema latente desde que se descubrió la heterogeneidad de la proteína ribosomal. Es el de la funcionalidad biológica de las distintas proteínas constitutivas del ribosoma. El problema está aún sin resolver, aunque algunos resultados experimentales han comenzado a aclarar ciertos extremos. Desde 1964 se sabe que los ribosomas de *E. coli* en presencia de CsCl se disocian en partículas más pequeñas (40 S y 23 S aproximadamente) que las ya conocidas subunidades ribosomales (144). Dos años más tarde se pudo comprobar que la disminución del coeficiente de sedimentación se debe a la pérdida de proteínas. En efecto, en el ribosoma completo de *E. coli* la proporción de proteína es de 37%, mientras que en las partículas de 40 S y 23 S es sólo del 30% (145) y, consecuentemente, la densidad de flotación en CsCl de estas partículas es menor que la del ribosoma completo o sus subunidades (146). La pérdida de proteínas hace al ribosoma totalmente inactivo en la biosíntesis de proteínas (145, 146) pero el fenómeno es reversible, ya que se pueden reconstruir ribosomas funcionalmente activos por adición a las partículas de 40 S y 23 S de las proteínas previamente escindidas. Además estas proteínas son específicas en la reconstrucción del ribosoma, es decir, sólo las proteínas escindidas de la subunidad 30 S pueden restaurar la actividad de la partícula de 23 S (146).

Estos resultados ponen de manifiesto, de una parte, la necesidad de que el ribosoma, para ser activo, mantenga su integridad en la que las proteínas juegan un papel importante y, de otra, señalan la diferencia entre las proteínas de ambas subunidades a un nivel en el que la electroforesis no aportaba datos.

De todas formas, mientras no se conozca a fondo la estructura de las proteínas ribosomales será difícil dilucidar el papel exacto de las mismas. Lo mismo puede decirse acerca de la arquitectura completa del ribosoma. En espera de que puedan conocerse datos decisivos por difracción de

rayos X, los resultados disponibles hasta la fecha, basados casi únicamente en la microscopía electrónica, son insuficientes.

1.4.3.2. *Presencia de los ribosomas.*

Los ribosomas se encuentran, como ya se ha mencionado, prácticamente en todas las células vivas. Principalmente se hallan en el citoplasma, aunque también se han podido observar en el núcleo (147, 148), mitocondrias (149) y cloroplastos (150, 151). Los ribosomas no citoplásmicos son semejantes a los estudiados hasta ahora, si bien recuerdan en sus propiedades físicas a los aislados de bacterias. Por ejemplo, el coeficiente de sedimentación de los ribosomas de cloroplastos de algas es de 70 S, mientras que el de los del citoplasma es de 80 S (152).

En el citoplasma los ribosomas pueden estar unidos a las membranas del retículo endoplásmico, formando el retículo rugoso, como ya se ha discutido. La unión se realiza, en este caso, a través de la subunidad mayor, como se deduce a partir de datos obtenidos por ultracentrifugación y microscopía electrónica (153). Pero también existen ribosomas libres en el citoplasma que pueden estar como simples monómeros o como polímeros, recibiendo en este último caso el nombre de polisomas.

La primera prueba de la existencia de los polisomas se obtuvo en 1962, cuando Warner y col. observaron que al preparar por métodos suaves ribosomas de reticulocitos gran parte de ellos se encuentran formando agregados, preferentemente de 5 o 6 unidades a juzgar por el coeficiente de sedimentación de los mismos (154). Poco después se confirmó la presencia de polisomas en reticulocitos tanto por ultracentrifugación (155) como por medio del microscopio electrónico (156) con el cual se ven bajo la forma de rosario o de racimo. Ese mismo año, 1963, se aislaron también polisomas de hígado (157) y de E. coli (158). Estos últimos podían contener hasta 10 unidades.

Existe una relación entre el número de unidades de un polisoma y la longitud de la cadena polipeptídica que sintetiza. Así, en las células productoras de anticuerpos se han encontrado dos tipos de polisomas, unos compuestos por 7 u 8 ribosomas y otros que pueden estar formados por 16-20 unidades (159). Los pequeños parecen dedicarse a la síntesis de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas y los grandes a la de las cadenas pesadas. Así pues, la magnitud de los polisomas es muy variable, pudiendo llegar a contener hasta 60 unidades en algunos casos de infección vírica (160). Más adelante se expone la razón de esta dependencia entre el tamaño del polisoma y el de la proteína sintetizada.

Parece ser que en los polisomas grandes los ribosomas se distribuyen en forma de hélice, en la que los ribosomas, 5 o 6 por vuelta de la hélice, se sitúan con su subunidad menor dirigida hacia el eje de la misma (161). Según este modelo, las interacciones proteína-proteína serían responsables, al menos en parte, de la estabilidad de los ribosomas (162). Esta hipótesis está sustentada por el hecho de que las enzimas proteolíticas son capaces de destruir la estructura polisómica (163).

En el aislamiento de polisomas se presentan serias dificultades, siendo poco frecuente la obtención de agregados de más de 10 ribosomas, a pesar de la aparente estabilidad "in vivo" de los polisomas. Es opinión muy generalizada que la rotura de polisomas durante su preparación se debe fundamentalmente a causas mecánicas, es decir a la actuación de fuerzas de cizalla en la homogeneización o en la resuspensión de algún sedimento de la centrifugación. Sin embargo, el mantenimiento de una temperatura baja a lo largo de todo el proceso de preparación es un factor crítico para la estabilidad del polisoma y su descuido puede ser, según Arnstein (162), la causa principal de la fragmentación de polisomas.

Las células del parénquima hepático tienen un extenso retículo endoplásmico con gran número de ribosomas adheridos, pero también abundan los ribosomas citoplásmicos libres. Parece ser que estos últimos sintetizan las proteínas propias de la célula, mientras que en los primeros se forman las proteínas destinadas a la exportación a otros tejidos (118). Esta suposición encaja perfectamente dentro de la teoría de Novikoff, generalmente admitida, sobre la funcionalidad de las distintas estructuras subcelulares (164).

Aunque el hígado es uno de los órganos que exhibe mayor actividad en la biosíntesis de proteínas (165), ésta tiene lugar en casi todos los tejidos. Este hecho justifica que la presencia de ribosomas se de en todas las células como reiteradamente se ha comentado.

En los reticulocitos, cuyo retículo endoplásmico está muy poco desarrollado y es siempre liso, los ribosomas no presentan asociación con ningún sistema membranoso lo que facilita notablemente su preparación.

En los últimos años se ha dedicado especial atención a los ribosomas cerebrales. Desde hace bastante tiempo se sabía que la mayor parte del RNA de las neuronas cerebrales estaba acumulado en los llamados corpúsculos de Nissl (166). Años más tarde se llegó al convencimiento de que tales estructuras eran en realidad sistemas membranosos del retículo endoplásmico con gran número de ribosomas adheridos (167). En la actualidad

el conocimiento de los ribosomas cerebrales es tan completo como pueda serlo el de los aislados de otros materiales biológicos (168, 169).

1.4.4. Biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares.

Antes de estudiar la secuencia de reacciones que constituyen cualquier proceso de biosíntesis es necesario conocer los requerimientos mínimos para que tal proceso se produzca. La conveniencia de realizar el estudio de estos requerimientos con sistemas "in vitro" es evidente, ya que la complejidad funcional del ser vivo dificulta, si no imposibilita, la investigación de una reacción aislada en sistemas "in vivo". El empleo de técnicas como la perfusión de órganos, incubación de cortes de tejidos o de suspensiones de células, que pueden agruparse bajo el nombre de "sistemas celulares", presenta la ventaja de evitar la influencia de los restantes órganos sobre la actividad biosintética en cuestión. Siguen, no obstante, presentando la complejidad total propia de la célula.

En el caso concreto de la biosíntesis de proteínas, las técnicas de perfusión han servido más para investigar aspectos fisiológicos de la formación de proteínas que para aclarar su mecanismo. Otro tanto puede decirse sobre la incubación de cortes de tejidos o células aisladas.

Ha sido pues necesario utilizar sistemas acelulares para llegar a conocer la totalidad de los requerimientos mínimos necesarios para la incorporación de aminoácidos a proteínas. La base de estos sistemas ha sido, en la inmensa mayoría de los casos, la incubación de fracciones microsomales o ribosomales con aminoácidos isotópicamente marcados. La radiactividad incorporada a las proteínas al fin de la incubación es una medida de la magnitud del proceso de biosíntesis.

Siekevitz (170) en 1952 describió el primer sistema capaz de formar "in vitro" enlaces polipeptídicos. Dos años más tarde Zamecnik y Keller perfeccionaron el primer sistema (170 a) Además de los microsomas era necesaria la presencia de ATP y de la fracción soluble celular. Fue ya en este periodo cuando se comenzó a investigar la composición y funcionalidad de la fracción microsomal como ya se ha indicado y, poco más tarde, el mismo grupo de Zamecnik consiguió demostrar que las enzimas necesarias para la biosíntesis de proteínas precipitan al llevar la fracción soluble a pH 5. La precipitación no entraña desnaturalización, por lo que las enzimas, una vez redisueltas a pH próximo a la neutralidad, sustituyen con éxito a la fracción soluble en los ensayos de incorporación de aminoácidos. El preparado, enzimas parcialmente purificadas, se conoce habitualmente con el nombre de "fracción enzimática pH 5" (171). Cuando se

utiliza este preparado en ensayos de biosíntesis de proteínas es necesario añadir una pequeña cantidad de GTP (172). Es cofactor, presente en la fracción soluble celular, no precipita a pH 5, por lo que falta de la fracción "pH 5". Como quiera que el ATP y el GTP se hidrolizan rápidamente en el medio de incubación y que su exceso inhibe la incorporación de aminoácidos (170), habitualmente se mantienen fijas sus concentraciones mediante un sistema reagerador (ácido fosfoenol pirúvico-pirúvico quinasa o fosfato de creatina-creatinquinasa).

La incorporación óptima de aminoácidos requiere además la presencia de iones minerales, Mg^{2+} , K^+ , y NH_4^+ , en concentraciones variables según la fuente utilizada para la preparación del sistema. El Mg^{2+} es necesario, en primer lugar, para evitar la disociación de los ribosomas; más adelante se describirá su importancia en la activación de aminoácidos. El K^+ y el NH_4^+ , parecen ser necesarios para la actuación en condiciones óptimas de la quinasa utilizada en el sistema regenerador de ATP (173).

Sobre la base general arriba apuntada son muy numerosos los sistemas descritos para la realización de la síntesis acelular de proteínas. Las modificaciones más importantes se recogen en la revisión que publicó von der Decken hace tres años (173). Merece la pena destacar la inclusión de sacarosa en numerosos medios de incubación debido a su papel como estabilizador del retículo endoplásmico (174). La adición de sacarosa es, naturalmente, innecesaria cuando se trabaja con ribosomas purificados en vez de fracciones microsomales brutas. Finalmente es necesario hacer mención de que para conseguir una incorporación óptima en sistemas acelulares de reticulocitos debe estar presente en el medio de incubación una mezcla de todos los aminoácidos (además del isotópicamente marcado). La incorporación llega a duplicarse si la composición de la mezcla de aminoácidos refleja la de la hemoglobina (175) proteína que representa casi el 70% de la sintetizada por dichas células (176).

1.4.5. Mecanismo de la biosíntesis de proteínas. Activación de aminoácidos.

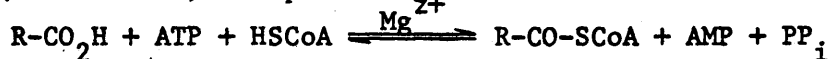
En el apartado 1.4.1. se puso de manifiesto la necesidad de un mecanismo, previo a la biosíntesis de proteínas, que active los aminoácidos, como una consecuencia del carácter endergónico de la formación de un enlace peptídico. En efecto, la energía libre estandar de hidrólisis de dichos enlaces es del orden de -500 cal/mol a pH 7 (177). Este valor es pequeño si se compara con el correspondiente a la hidrólisis del éster de un aminoácido ($G^\circ = -8.4 \text{ Kcal/mol}$) (178) y es, naturalmente, inferior a la energía de hidrólisis del ATP (-11 Kcal/mol aproximadamente) que, como es

bien sabido es el donador de energía, prácticamente universal, en las reacciones biológicas. De todas formas, no es despreciable y es evidente que la formación de un enlace peptídico no puede transcurrir de un modo espontáneo.

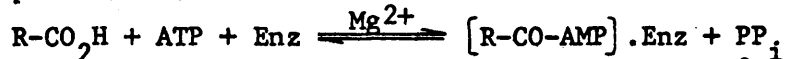
La activación de aminoácidos, como paso previo a la biosíntesis de proteínas, se observó por primera vez en 1955, cuando Hoagland detectó la formación de hidroxamatos como consecuencia de la incubación de aminoácidos en presencia de hidroxilamina, ATP y la fracción soluble que contiene las enzimas necesarias para la síntesis de proteínas (179). El proceso no tiene lugar en ausencia de ATP ni si se omite el preparado enzimático. Poco después del descubrimiento de Hoagland, otros investigadores llegaron a idénticos resultados y pusieron de manifiesto que la formación de hidroxamatos se producía tanto en presencia de fracciones solubles como de la fracción enzimática "pH 5" (180-182). En todos los casos era necesaria la participación de iones Mg^{2+} para que se produjera la reacción de activación.

En 1957 Hoagland y col. encontraron que cuando la fracción enzimática "pH 5" se incubaba con ATP, Mg^{2+} y aminoácidos marcados isotópicamente, parte de la radiactividad aparece en el precipitado obtenido al detener la reacción con ácido tricloroacético, pero se elimina del precipitado por extracción con el mismo ácido a 90°. Este resultado sugería que los aminoácidos en tales condiciones se unían no a una fracción proteica, sino a un RNA que se hidrolizaría al calentar. Un año más tarde se pudo confirmar la existencia de un RNA de bajo peso molecular en la fracción "pH 5" (172). Este RNA soluble (sRNA) tiene un coeficiente de sedimentación de unos 4 S y su peso molecular (20.000-25.000) indica que está constituido por 70-90 nucleótidos.

En aquellos años se conocía con bastante precisión el mecanismo de activación de los ácidos grasos. La formación de acil-coenzima A, paso previo a la oxidación de los ácidos grasos tiene lugar mediante la concurrencia de ATP, Mg^{2+} y la correspondiente enzima: ácido: coenzima A ligasa (AMP) (EC. 6.2.1.-). El proceso global:



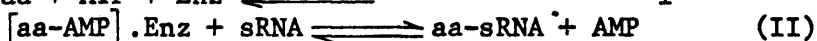
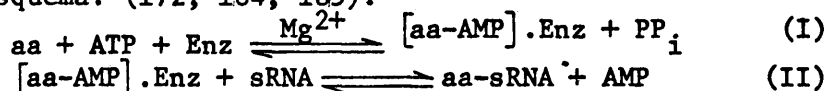
transcurre realmente en dos etapas. En la primera se forma un acil adenilato -que permanece unido a la enzima- con la liberación de pirofosfato:



y en la segunda - que ya no requiere la presencia de Mg^{2+} - el resto acilo se transfiere a la coenzima A:



La semejanza de requerimientos entre la activación de ácidos grasos , y de aminoácidos hizo que se admitiera para esta última reacción el siguiente esquema: (172, 184, 185):



en el que la misma enzima catalizaría ambas etapas (186). En realidad la reacción global tendría lugar en la superficie de las enzimas que comenzaron a denominarse aminoacil-sRNA sintetetasas. El esquema quedó confirmado cuando se pudo detectar la presencia de aminoaciladenilatos al realizar la incubación con cantidades de enzima semejantes a las de sustrato (187, 188) y más aún cuando Webster y Davie consiguieron aislar el complejo seril-AMP-enzima (189). Además los aminoaciladenilatos sintéticos se descomponen en aminoácido y ATP al incubarlos con fracciones enzimáticas y pirofosfato (188,190) y ceden al aminoácido al sRNA cuando la incubación se realiza en presencia de este último (191).

La unión de los aminoácidos y el sRNA es de tipo ester entre el carboxilo del aminoácido y uno de los hidroxilos libres de la ribosa del nucleotido OH terminal del sRNA. En este sentido apuntaron las primeras experiencias al demostrar que si el sRNA se sometía a tratamiento con periodato (con la consiguiente oxidación de los hidroxilos en cis del extremo OH terminal) perdía su capacidad de aceptar aminoácidos (192). Es más, cuando un aminoacil-sRNA se hidroliza con ribonucleasa se obtiene siempre el aminoácido unido por su carboxilo a un resto de adenosina a través de uno de los hidroxilos libres (2' o 3') de su ribosa (192, 193). Este hecho sugiere por otra parte -y más adelante se dará cuenta de ello- que todos los sRNA poseen un resto de ácido adenílico en su extremo OH terminal. Una última evidencia a favor de la unión ester entre el aminoácido y el sRNA puede ser el que los aminoacil-sRNA son capaces de formar hidroxamatos de aminoácidos por reacción no enzimática con hidroxilamina neutralizada a una velocidad semejante a la observada con los esteres sintéticos de aminoácidos (172, 194). De esta forma puede concluirse que la activación de aminoácidos tiene lugar realmente en la reacción I, ya que la energía libre de formación de un ester es inferior (en valor absoluto) a la del anhídrido mixto que supone el adenilato.

1.4.5.1. Aminoácido: tRNA ligasas (AMP) (Aminoacil-sRNA sintetetasas).

Una vez considerados los aspectos históricos preliminares de la activación de aminoácidos, se tratará en este apartado de la naturaleza, propiedades y especificidad de las aminoacil-sRNA sintetetasas. Es tiempo ya, sin embargo, de comenzar a designarlas con el nombre sistemático aceptado

actualmente de aminoácido: tRNA ligasas (AMP) (EC. 6.1.1.-). Por el mismo motivo la designación tRNA -abreviatura de RNA de transferencia- sustituirá a la más equívoca de sRNA que, por razones históricas, se ha venido usando hasta ahora. El motivo de esta nomenclatura quedará expuesto en el siguiente apartado, dedicado al estudio de esta especie de RNA tan importante en las primeras etapas de la biosíntesis de proteínas.

Ya desde el principio se advirtió que no había una enzima única capaz de activar todos los aminoácidos sino que para cada uno de ellos existía al menos una enzima específica. Utilizando una fracción enzimática cruda tal como la "pH 5" cuando se alcanzaba el nivel de saturación (velocidad máxima) para un aminoácido dado, la reacción de activación (I) continuaba al añadir al sistema un segundo aminoácido y así sucesivamente (179, 195).

El aislamiento de aminoácido: tRNA ligasas específicas presenta las dificultades propias de todo aislamiento de enzimas. Como suele ser habitual en estos casos no existe un método generalizado para conseguirlo y se han de emplear sucesivamente varias de las técnicas usuales en la purificación de proteínas. Ha de evitarse en todos los pasos la disolución en agua de estas enzimas que tienden a perder actividad en medios hipotónicos (173). En la actualidad son muchas las ligasas aisladas a partir de materiales biológicos muy variados aunque la mayor parte de los trabajos se han realizado con *E. coli*, levaduras o hígado de rata (186, 196, 197). Se ha puesto a punto también un método para aislar, a partir de *E. coli*, un extracto que contiene exclusivamente las ligasas correspondientes a los 20 aminoácidos proteicos (198).

La mayor parte de las enzimas aisladas tienen un peso molecular próximo a 100.000 (Tabla IV). Quizá la única excepción sea la correspondiente a la fenilalanina. En algunos casos, enzimas homólogas aisladas de diferentes materiales biológicos poseen propiedades físicas distintas. Tal es el caso de las enzimas activantes de tirosina aisladas de *B. subtilis* y *E. coli* que difieren no sólo en su peso molecular (Tabla IV) sino también en su movilidad electroforética, tanto en gel de poliacrilamida como de almidón y en su comportamiento antigénico (201). No obstante, como se verá más adelante, su especificidad frente a la reacción II es idéntica.

La mayor parte de las ligasas parecen requerir específicamente ATP como donador de energía. Hasta hace poco no se había encontrado ningún caso en el que la activación pudiese llevarse a efecto con otro trifosfato. Incluso se había descrito la inhibición producida por el dATP en la activación de la tirosina mediante la enzima aislada de *E. coli* o *B. subtilis*

TABLA IV

PESOS MOLECULARES DE DIFERENTES AMINOACIDO:tRNA LIGASAS (AMP)

<u>Aminoácido</u>	<u>Material biológico</u>	<u>Pesos molecular</u>	<u>Ref.</u>
isoleucina	E. coli	112.000	(199)
valina	levadura	116.000	(200)
lisina	levadura	113.000	(200)
tirosina	E. coli	95.000	(201)
tirosina	B. subtilis	88.000	(201)
fenilalanina	E. coli	180.000	(202)
fenilalanina	levadura	180.000	(203)

(204). Pero en la actualidad se opina que el dATP puede sustituir al ATP en la formación de aminoacil-tRNA. El grupo de Zamecnik obtuvo la primera comprobación en 1966 trabajando con lisina:tRNA ligasa de E. coli (205) y en 1969 Mitra y Mehler parecen haber generalizado la participación del dATP en la activación de aminoácidos. La velocidad máxima de la reacción global de formación de aminoacil-tRNAs es semejante usando dATP y ATP, pero, sin embargo, el valor de K_m es mayor en el primer caso (206).

Es interesante revisar los datos que conciernen a la especificidad de las ligasas con respecto a los aminoácidos. Las enzimas deben poseer una doble especificidad: por una parte han de reconocer al aminoácido, sustrato de la reacción I; por otra al tRNA (reacción II). Con respecto a la primera, única objeto del presente apartado, los datos iniciales sugerían una especificidad clara aunque no absoluta. Así, la valina:tRNA ligasa de E. coli puede activar también la treonina aunque la velocidad máxima de la reacción es inferior y la K_m es unas 100 veces superior que para su sustrato natural (207). Algo semejante ocurre con la isoleucina:tRNA ligasa que es también capaz de activar la valina (208).

Otras enzimas no son capaces de activar más aminoácidos naturales que el propio aunque sí catalizan el intercambio ATP-PP_i en presencia de análogos sintéticos de los aminoácidos. Es el caso, por ejemplo, de la tirosina:tRNA ligasa que activa también la D-tirosina, la 3-fluorotirosina y la 3-hidroxitirosina, aunque en todos los casos la K_m para la reacción I es mayor y la velocidad máxima menor que la correspondiente a la L-tirosina (204). Son numerosos los casos semejantes que demuestran esta especificidad estrecha aunque no absoluta a que antes se aludía. (191,197).

1.4.5.2. RNA de transferencia.

Antes de pasar a discutir el mecanismo de la activación de aminoácidos es necesario estudiar las propiedades del tRNA, al cual quedará unido el aminoácido al término de la reacción II. .

Como ya se ha aludido, desde el principio se observó que el tRNA tiene un coeficiente de sedimentación comprendido entre 3.8 (209) y 4.6 S (210) y contiene 70-90 nucleótidos (172, 186, 211). No existe un tRNA único para todos los aminoácidos ya que al realizar la reacción de activación con una cantidad fija de tRNA cada aminoácido se une a él en una proporción variable y, una vez saturado el tRNA con un aminoácido, sigue progresando la reacción al añadir otro distinto. (172, 194, 208, 210, 212). Incluso la situación es más compleja que en el caso de las ligasas, ya que está demostrada la existencia de más de un tRNA específico para la mayor parte de los aminoácidos.

Los preparados crudos de tRNA se obtienen fácilmente por extracción con fenol o con bromuro de cetiltrimetilamonio y NaCl (127, 209). La purificación es ya más compleja y requiere, en la mayor parte de los casos, el empleo de técnicas cromatográficas (213-215).

El fraccionamiento del tRNA para aislar las distintas especies propias de los diferentes aminoácidos es aún más complejo. Son varios, sin embargo, los procedimientos que pueden emplearse para llevar a cabo tal fraccionamiento, unos basados en las propiedades físicas, otros apoyados en la modificación química que supone su aminoacilación.

Entre los primeros cabe destacar la distribución en contracorriente, cuya eficacia en la separación de tRNA fue ya apuntada en 1958 por Warner y Vaimberg (216). De esta manera el grupo de Holley pudo aislar en 1959 tRNA específico de alanina (abreviadamente tRNA^{ala}) a partir de levadura (217). Los mismos autores consiguieron perfeccionar la técnica en años sucesivos, obteniendo un preparado de gran actividad y en cantidad y pureza suficiente para realizar estudios estructurales (213, 218-220). Con variantes más o menos importantes, la distribución en contracorriente se ha usado por otros investigadores para la obtención de tRNA^{val} (221), tRNA^{phe} (222) y tRNA^{ser} (223, 224) entre otros. Naturalmente la purificación no es posible en todos los casos y, en ocasiones, la distribución en contracorriente sólo conduce a preparados enriquecidos en un tRNA.

Este método de separación sirvió además para iniciar una interesante cuestión en el estudio de los tRNA: la de su heterogeneidad. Holley y col. demostraron la existencia de varios máximos de actividad para tRNA^{leu}, tRNA^{tyr} y tRNA^{thr} de levadura a lo largo de las distintas fracciones obte

nidas (219, 220, 225) y de dos máximos para el tRNA^{lys} de hígado de rata (226). A semejantes resultados se llegó al fraccionar los tRNAs de E. coli (227, 228), obteniéndose hasta cinco máximos de actividad para el tRNA^{leu} (229). No obstante, el comportamiento heterogéneo de los tRNA en la distribución en contracorriente no es, por sí solo, suficiente para decidir la existencia real de varias especies moleculares distintas para un tRNA aceptor de un mismo aminoácido. En tal sentido han llamado la atención RajBhandary y Stuart (230), apoyándose en la semejanza de los oligonucleótidos en que se escinden enzimáticamente dos tRNA^{ser} separables por distribución en contracorriente (231).

Las técnicas cromatográficas se han aplicado también con éxito al fraccionamiento de tRNA. Tras un primer intento mediante cromatografía de reparto utilizando ácido silícico como soporte (232) la separación de distintos tRNAs se ha conseguido por medio de una gran variedad de técnicas. Se ha empleado, por ejemplo, la cromatografía en geles de dextrano (233), los cambiadores de iones como DEAE-celulosa (234, 235) y DEAE-Sephadex (236), y las columnas de albúmina metilada adsorbida sobre soportes de kieselguhr (237), ácido silícico (238) o Hyflo-Super Cel (239).

Los métodos cromatográficos, en general, no permiten el aislamiento de tRNA específicos con tanta pureza como los basados en la distribución en contracorriente, a no ser que la mezcla se someta a una serie sucesiva de desarrollos (240). Otra posibilidad, basada en la diferente estabilidad térmica de los distintos tRNA, ha sido aprovechada por Baguley y col. (241) para aislar un tRNA^{lys} de levadura, con pureza del 80%, en columna de DEAE-celulosa eluida a temperatura gradualmente aumentada hasta 65°.

Finalmente, es necesario mencionar que la cromatografía de tRNA con albúmina metilada ha servido también para poner de manifiesto la heterogeneidad de los mismos, es decir, la posible existencia de varias especies para un mismo aminoácido (242).

El segundo gran grupo de técnicas utilizables en el aislamiento de tRNA específicos se basa en la diferencia de propiedades químicas de un tRNA según esté o no aminoacilado. La mezcla de tRNAs se incuba con ATP, enzimas y Mg²⁺ en presencia del aminoácido, con lo que el tRNA específico del aminoácido forma enlace ester con él, mientras que los demás quedan inalterados. Los tRNA que no han reaccionado siguen poseyendo dos hidroxilos en cis en la ribosa 3' terminal lo que permite su oxidación a dialdehído con periodato en condiciones que no afectan al aminoacil-tRNA. Zamecnik y col. (243) aprovecharon la aparición de este dialdehído para introducir, por reacción con la hidrazida del ácido 2-hidroxil-3-naftoico y

posterior copulación con o-dianisidina tetraazotada, una modificación química notable en el tRNA no esterificado, que permite separarlo por precipitación fraccionada del aminoacil-tRNA. Por hidrólisis de este último puede obtenerse el tRNA específico. La combinación de esta técnica con algún proceso cromatográfico permite obtener tRNAs con pureza de hasta el 90% (223, 236, 244).

A diferencia del método precedente en el que se hacía uso de una propiedad del tRNA no esterificado, Mehler y Bank (245) propusieron la precipitación del aminoacil-tRNA basándose en que la presencia del grupo amino libre del resto aminoacilo podía servir como iniciador de la polimerización del anhídrido de N-carboxi-ε-trifluoroacetil-lisina. El aminoacil-tRNA precipita unido al polímero y el tRNA específico puede recuperarse por saponificación del ester que forma con el aminoácido, el cual permanece unido al polímero. Katchalski y col. perfeccionaron posteriormente la técnica, utilizando como monómero el anhídrido de N-carboxi-β-aspartato de bencilo (246, 247).

El extremo OH terminal de todos los tRNA posee la secuencia pCpCpA (246). Esta fue la primera observación estructural realizada sobre estos RNA que, por su reducido tamaño molecular atrajeron la atención desde el principio como un material especialmente apto para investigaciones de estructura primaria. Menos se pudo progresar por el extremo P-terminal. Utilizando tRNAs crudos se obtenía como único nucleótido P-terminal ácido guanfílico (210) pero el segundo ya no era común a todas las especies de tRNA y, por tanto, los estudios de estructura primaria quedaron en suspenso hasta disponer de métodos de purificación aceptables. No obstante, se pudo constatar aún con preparados crudos que en los tRNA abundaban relativamente bases poco usuales en otros RNA. Así, es en ellos frecuente la presencia de ácido pseudouridílico, bases metiladas, ácido timidílico y otros aún menos frecuentes como el isopenteniladénico (243, 249).

Holley y col. que, como acaba de discutirse, pusieron a punto técnicas de aislamiento de tRNA específicos, fueron los primeros en describir la secuencia completa de uno de ellos: el tRNA^{ala} de levadura (250-252). Después de este trabajo inicial han sido numerosos los que, haciendo uso de los métodos actualmente disponibles para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos, han puesto de manifiesto las estructuras primarias de diversos tRNA. En la actualidad se conocen las secuencias completas de dos tRNA^{ser} (253), tRNA^{tyr} (254), tRNA^{phe} (255) y tRNA^{val} de *Saccharomyces*; tRNA^{val} (257), tRNA^{ile} (258) y tRNA^{tyr} (259) de *Torulopsis utilis*; dos tRNA^{tyr} (260), tRNA^{met}_F (261) y tRNA^{met}_M (261 a) (*) de *E. coli*;

(*) Más adelante se verá el significado de esta diversidad de los tRNA^{met} de *E. coli*.

un tRNA^{phe} de germen de trigo (262) y un tRNA^{ser} de hígado de rata (263). Además, se conocen parcialmente las secuencias de un tRNA^{phe} (264) y un tRNA^{val} (265) de E.coli.

A efectos de comparación entre todas estas estructuras Ebel propuso ya en 1968 (266) la división de las secuencias de los tRNA en seis zonas. El extremo 5' terminal (zona I) comprende 8 nucleótidos. El nucleótido ter minal suele ser ácido guanílico, como anteriormente se había encontrado, pero esta situación no se da de un modo absoluto: el nucleótido terminal es ácido citidílico en tRNA^{tyr} de *Torulopsis utilis* (259), tRNA^{tyr} de *Saccharomyces cerevisiae* (254) y tRNA^{met}_F de E. coli (261). A continuación se puede descubrir una zona II compuesta por 17-19 nucleótidos caracterizada por la presencia de varios restos de ácido dihidrouridílico. La zona III, que contiene el anticodon será objeto de una discusión posterior. La zona IV es de secuencia muy variada y contiene distinto número de nucleótidos (entre 3 y 13) según los diferentes tRNA. En la zona V (17-19 nucleótidos) se encuentra en todos los casos investigados hasta la fecha la secuencia común pGpTpψpC y, finalmente, la VI, 3' terminal, sólo tiene de común el extremo pCpCpA.

Las semejanzas entre tRNAs homólogos de distintos organismos son extraordinarias. Baste como ejemplo señalar que de los 85 nucleótidos que contienen los tRNA^{ser} de levadura e hígado de rata, 68 son idénticos.

Hace más de 10 años que se realizaron los primeros estudios sobre la estructura secundaria de los tRNAs. La aplicación de las técnicas de dispersión óptica rotatoria a preparados brutos de tRNA reveló la presencia de doble hélice (211, 267, 268), que se supuso estabilizada por enlaces de hidrógeno de modo semejante al propuesto por Watson y Crick para el DNA. Precisamente Crick había extendido, en relación con el tRNA, su teoría del apareamiento de bases más allá de lo puramente estructural. En 1958 postuló que la especificidad de las secuencias de proteínas estaría asegurada si existiera un RNA monocatenario sobre el que se situaran, mediante complementación de bases, los correspondientes tRNAs portadores de los aminoácidos (269). El orden de aminoácidos vendría así determinado por el de las bases del RNA monocatenario que actuaría a modo de molde ("template"). Serían necesarias por lo menos tres bases para especificar la posición de cada aminoácido ya que habida cuenta de que son 4 los nucleótidos habituales en el RNA las combinaciones que pueden hacerse con dos de ellos ($4^2=16$) no son suficientes para determinar sin ambigüedad uno de los 20 aminoácidos. Esta hipótesis de Crick era compatible con la helicidad del tRNA, ya que para que exista en éste complementación intra-

molecular es necesario que haya por lo menos una zona en la que la cadena, se doble sobre sí misma y esa zona, por tanto, permitiría la posterior unión al "template" al no estar apareadas las bases que la constituyen. Este es el soporte teórico de la estructura de "horquilla" que propuso Zubay para el tRNA (270). Sin embargo, algunos datos están en contra de dicha estructura. Por ejemplo, al estudiar la hipercromicidad del tRNA como consecuencia de la destrucción de enlaces de hidrógeno por calentamiento, se observó que sólo un 40-60% de las bases estaban apareadas (268), hecho más en consonancia con el modelo de Fresco y col. (271) que postulaba la existencia de varias zonas sin complementación.

Cuando Holley y col. (250-252) establecieron la estructura primaria del primer tRNA se confirmó que sólo 40 bases de las 77 que componen el tRNA^{ala} podían disponerse espacialmente de forma que estableciesen enlaces de hidrógeno entre ellas. Esto se podía conseguir con tres estructuras que incluían regiones de doble hélice y regiones sin aparear. La que desde el principio pareció más probable comenzó a llamarse de "hoja de trébol" por cuanto había en ella tres zonas que suponían otros tantos plegamientos de la cadena sobre sí misma en las que se situaban las bases no apareadas. Es posible disponer todas las secuencias conocidas de tRNA en estructuras de "hoja de trébol". En todos los casos uno de los lazos está ocupado por el anticodon, esto es, el triplete de bases destinado a unirse al "template". En otro lazo se encuentra la secuencia común GT ψ C y en el tercero se sitúan los restos de ácido dihidrouridílico característicos de la zona II.

Se han realizado numerosos estudios químicos que, determinando la accesibilidad de diferentes reactivos a las distintas zonas de la molécula de tRNA, son válidos para obtener más datos sobre su estructura (266). Particularmente importante es el hecho de que la zona V que contiene la secuencia GT ψ C está dotada de una reactividad muy débil. Estos resultados sugieren una cierta protección espacial de esta zona pero no son incompatibles con la estructura de "hoja de trébol" y han inducido a Cramer (272) a proponer la existencia de una estructura terciaria que supone un plegamiento de la "hoja de trébol" de manera que las bases ψ T de la zona V pasen a formar enlace de hidrógeno con la secuencia AG que se encuentra en la zona II de todos los tRNA y las bases GG de esta zona lo hagan con la secuencia CC del triplete 3' terminal. Concuerda perfectamente con esta hipótesis el estudio de Lake y Beeman (273) quienes, mediante difracción de rayos X en cristales de tRNA, de levadura, comprobaron la presencia de cuatro ramas en él, tres muy juntas y la cuarta (según el modelo de Cramer sería la que contiene el anticodon) dirigida en sentido opuesto.

1.4.5.3. Especificidad de la aminoacilación de tRNA.

Se ha visto en el apartado 1.4.5.1. como las aminoácido:tRNA ligasas poseen una notable, aunque no absoluta, especificidad en la activación de aminoácidos (reacción I). Queda por estudiar la especificidad de la reacción II (aminoacilación del tRNA). En general puede decirse que es aún más estrecha que para la reacción I. En algunos casos pueden transferirse análogos del aminoácido al tRNA, como ocurre con derivados fluorados del triptófano: tRNA ligasa se unen al tRNA^{try} e incluso se incorporan a las proteínas (274, 275).

Estos "errores" no se producen nunca, sin embargo, entre los aminoácidos naturales. Así, aunque, como se ha comentado anteriormente, la isoleucina:tRNA ligasa puede activar la valina, no cataliza la incorporación de este último aminoácido al tRNA (208). Hablando en términos cinéticos puede decirse que si la K_m para la activación de un aminoácido aumenta cuando no es el sustrato propio de la ligasa, se hace aún mayor para la reacción de transferencia al tRNA (197), lo que constituye un mecanismo de protección contra la incorporación de aminoácidos extraños a las proteínas. Todavía existe un nuevo mecanismo de control para asegurar la esterificación correcta de los tRNAs. Como demostraron Baldwin y Berg (276) los complejos ligasa-aminoácido-AMP se hidrolizan en presencia del tRNA aceptor natural.

El hecho de que existan tales mecanismos de seguridad parece indicar que es realmente importante para la vida de un organismo el que la síntesis de aminoacil-tRNA se realice en la forma adecuada. Una notable experiencia de von Ehrenstein y col. (277) confirmó esta suposición, al tiempo que constituía una prueba indirecta de la hipótesis de Crick. Se obtuvo cySH-tRNA^{cySH} por incubación del aminoácido con tRNA y enzimas de *E. coli* y por reducción con Ni-Raney se convirtió en alanina el resto de cisteína. Al incubar el ala-tRNA^{cySH} con ribosomas y enzimas en las condiciones adecuadas se pudo aislar una proteína en la que la alanina sustituía parcialmente a la cisteína. Este hecho da cuenta de la importancia que tiene la adecuada esterificación del tRNA ya que indica que, una vez aminoacilado, el tRNA es el único responsable de la colocación en su lugar del aminoácido, sin que éste intervenga ya en la determinación de su posición en la proteína.

Es interesante considerar algunos aspectos de la especificidad de especie frente al conjunto de las reacciones I y II. Se ha observado en bastantes casos cómo un aminoácido puede incorporarse al tRNA aislado de un organismo en presencia de ligasas procedentes de otras especies (197). Existe, desde luego, una cierta especificidad, cuyo nivel real no está del to-

do claro. Staehelin y col. (262) han demostrado que la K_m de la serina: tRNA ligasa de hígado de rata es idéntica en presencia de tRNA^{ser} de hígado y de levadura, pese a que, como se ha visto, sus secuencias difieren parcialmente. Lagerkvist y Waldenström (195) encontraron que varias ligasas purificadas de E. coli eran capaces de esterificar tanto el tRNA de dicha bacteria como el de levaduras, mientras que las mismas ligasas aisladas de levadura eran menos eficaces en la aminoacilación del tRNA de E. coli.

Todos estos estudios plantearon con más fuerza un problema latente desde el principio: el del reconocimiento entre una ligasa y el tRNA. La asociación enzima-tRNA puede llevarse a efecto mediante enlaces de hidrógeno, hidrófobos o fuerzas de dispersión. Es necesario que exista en la superficie de la enzima una zona capaz de tal asociación, que, por supuesto, no tiene por qué ser el centro activo. Zamecnik postula la participación de restos de histidina, triptófano, serina, tirosina o lisina por parte de la ligasa (278), pero la dificultad está realmente en dilucidar de que manera puede ser tan específica una interacción RNA-proteína.

Poco es lo que puede decirse de tal interacción a nivel de la enzima ya que, hasta el momento presente, no se conoce ninguna secuencia completa de ligasas, pero son numerosos los trabajos que se han realizado para localizar las secuencias del tRNA que intervienen en el reconocimiento de la enzima. Aunque es un punto muy discutido, parece que el anticodon no está implicado en tales interacciones (266). Tampoco parece lógico que en una interacción tan específica participen zonas del tRNA como la secuencia común GTΨC que se encuentran en todos ellos en posición semejante. A pesar de los numerosos trabajos realizados para localizar la zona de interacción con la ligasa por modificación química o enzimática de las bases, aún no se ha conseguido ponerla de manifiesto. Parece claro que la metilación de tRNA reduce su capacidad de aminoacilación (239), mientras que la influencia de la desmetilación no lo es tanto. Utilizando mutantes de E. coli auxótrofos de metionina, cultivados en ausencia de este aminoácido pueden obtenerse tRNAs cuya proporción de bases metiladas es inferior a la normal. Mientras que Peterkofsky y col. (279) y Starr (280) no encontraron diferencias entre estos tRNAs poco metilados y los normales a la hora de formarse el aminoacil-tRNA, los resultados de Shugart y col. (281) parecen indicar que el defecto de metilación impide notablemente el ensamblamiento del tRNA sobre la ligasa. Otra forma de atacar el problema de las interacciones tRNA-enzima consiste en estudiar la inhibición de la reacción al someter al tRNA a una degradación progresiva con fosfodiesterasa. Stulberg e Isham (282) han concluido de esta manera que el centro de unión a la enzima se encuentra en la mitad de la molécula de tRNA correspondiente al extre

mo 5' terminal.

De todas formas, los datos actuales son aún escasos y para dilucidar esta cuestión y -probablemente- será necesario para ello conocer más a fondo la naturaleza de las interacciones específicas entre ácidos nucleicos y proteínas.

1.4.6. RNA mensajero.

La hipótesis de Crick (269), antes discutida, exigía, además de la existencia de un tRNA, la de un RNA monocatenario que actuase a modo de molde. Conocida ya en esas fechas la participación de los ribosomas en la biosíntesis de proteínas, así como su composición, el rRNA fue el primer candidato para el papel de "template". Dos hechos, sin embargo, hicieron reconsiderar tal asignación. De una parte, la gran semejanza de composición y tamaño molecular de rRNAs aislados de organismos muy variados no parecía estar de acuerdo con la diversidad de sus proteínas. De otra, la estabilidad y escasa renovación metabólica del rRNA parecía hacerlo incompatible con una función de "template", habida cuenta de la rapidez con que la síntesis de proteínas comienza o se detiene en determinados casos de inducción de enzimas, infección vírica, etc.

En este sentido, Jacob y Monod (283) postularon la existencia de un RNA "mensajero" (mRNA). Este mRNA sería muy activo metabólicamente y serviría para adaptar sobre él los diferentes aminoacil-tRNA en el orden adecuado. Según esta hipótesis el ribosoma actuaría como un soporte - más o menos pasivo - en la formación del enlace peptídico. El mRNA se podría sintetizar sobre el DNA nuclear, con lo que la constancia genética de las proteínas quedaría asegurada según el siguiente esquema:

DNA $\xrightarrow{\text{(transcripción)}}$ mRNA $\xrightarrow{\text{(traducción)}}$ proteínas

Casi simultáneamente a la emisión de la hipótesis de Jacob y Monod se pudo demostrar la presencia en bacterias de una fracción de RNA, cuya síntesis se realizaba rápidamente (284, 285) y poco después se llegó a una conclusión similar en organismos pluricelulares (286-288). Para caracterizar este RNA de síntesis rápida se utilizó desde el principio la incubación con precursores de RNA isotópicamente marcados durante tiempos muy breves (inferiores al minuto), seguida del aislamiento del RNA total. Después de una adecuada separación, la fracción de éste que aparecía marcada era indudablemente la de síntesis más rápida. Numerosos autores estudiaron estas fracciones, llegando a la conclusión de que se trataba de una fracción físicamente heterogénea, como se desprendía de su comportamiento en

la centrifugación de zona o en la separación cromatográfica (128, 284, 285). Su coeficiente de sedimentación en *E. coli* normal está comprendido entre 6 y 30 S (289). Esta heterogeneidad es la que cabe esperar de un mRNA conocida la de las proteínas a que han de dar lugar.

Por otra parte, Brenner y col. (290) demostraron que, como consecuencia de la infección de *E. coli* con el fago T-2 aparece unido a los ribosomas preexistentes un nuevo RNA, que se sintetiza en un tiempo muy breve y cuya existencia de bases es complementaria a la del DNA del fago. Aunque la validez de alguna de estas experiencias fue posteriormente puesta en duda (291), la hipótesis de Jacob y Monod quedaba inicialmente apoyada.

Mención aparte por su trascendencia merece el trabajo de Nirenberg y Matthaei que en 1961 demostraron que el producto de la incubación de ribosomas con un homopolinucleótido sintético, el ácido poliuridílico (poliU), era un homopolipéptido, la polifenilalanina (292), hecho que, si bien no aportaba datos a favor de la existencia de mRNA natural, si confirmaba plenamente las predicciones de Crick y abría el camino al esclarecimiento del código genético.

Las investigaciones de los años siguientes se centraron, pues, en la caracterización del mRNA, en el mecanismo de su síntesis sobre el DNA, en su asociación al ribosoma y al tRNA y en su degradación.

1.4.6.1. Caracterización del mRNA.

La hipótesis del RNA mensajero resultó fácil de comprobar en ciertos casos particulares. Así, el RNA aislado de fagos que contienen este tipo de ácidos nucleicos dirige la síntesis de las proteínas de su cápsida cuando se incuba con un sistema acelular aislado de *E. coli* (293, 294) o *Eugle*na gracilis (295). Pero la existencia de mRNA en células no infectadas resulta difícil de comprobar. En primer lugar representa una fracción muy reducida del RNA celular total (290) y, además, su inestabilidad hace tan difícil su aislamiento (127) que, hasta la fecha, no ha sido posible la obtención de un mRNA puro.

Estas dificultades hacen que su caracterización sólo sea posible por técnicas indirectas. Un mRNA ha de poseer una secuencia de bases complementaria a la del DNA sobre el que se haya sintetizado -característica por otra parte común a todos los tipos de RNA- pero la ausencia de asociaciones intramoleculares permite el uso de la hibridación RNA-DNA (296) como un criterio para la caracterización del mRNA. La posibilidad de separar los híbridos sobre membranas de nitrato de celulosa (297) o en columnas de agar (298) ha supuesto, por otra parte, una nueva posibilidad en el aisla-

miento de mRNAs (299).

La descripción de un sistema capaz de sintetizar polipéptidos dirigidos por RNA exógeno (292) abrió también una nueva vía a la caracterización de mRNA. Haciendo uso de ella, Tissières y Hopkins demostraron que la fracción de RNA de *E. coli* capaz de estimular la incorporación de aminoácidos a proteínas "in vitro" coincidía con la de síntesis más rápida al someterla a centrifugación en gradiente (300). En sistemas procedentes de mamíferos la caracterización de mRNA más clara quizá sea la realizada sobre el RNA aislado de reticulocitos por su capacidad de dirigir "in vitro" la síntesis de hemoglobina (301-303).

Hoy día, la existencia del mRNA está fuera de toda duda, pero, no obstante, su caracterización no deja de ser un problema. La falta de un criterio claro para establecer sin lugar a dudas una función de mensajero en el RNA y la dificultad de su aislamiento, son los principales responsables de esta limitación.

1.4.6.2. *Biosíntesis del mRNA.*

La síntesis enzimática del RNA sobre el DNA (transcripción) es el proceso por el que queda asegurada la constancia hereditaria de los organismos. En sus aspectos mecánicos, la síntesis de mRNA no difiere de la del resto de los RNAs. El proceso está catalizado por la RNA polimerasa, enzima que ha sido objeto de abundantes estudios en los últimos años, y transcurre a partir del extremo 5' terminal (304). Aunque la investigación de la biosíntesis de polirribonucleótidos comenzó en 1955 con los estudios de Grunberg-Manago y Ochoa (305), son todavía numerosos los trabajos y revisiones publicados sobre el tema (véase, por ejemplo, la referencia 306).

Para el presente estudio, sin embargo, sólo es de pleno interés la consideración de los aspectos particulares de la biosíntesis del mRNA y como quiera que tales aspectos están íntimamente relacionados con el control de la biosíntesis de proteínas, serán tratados más adelante.

1.4.6.3. *Unión del mRNA al ribosoma.*

En 1962 Warner, Rich y Hall (154) obtuvieron -como se apuntó anteriormente- la primera microfotografía de polisomas. Un año después investigadores del mismo grupo consiguieron, mediante un perfeccionamiento de su técnica, descubrir la presencia de un material filamentososo que servía de nexo de unión entre los distintos monómeros del polisoma (307) e interpretaron tal imagen como correspondiente al mRNA.

Los primeros estudios de asociación mRNA-ribosoma se realizaron con polinucleótidos sintéticos; así se comprobó que los ribosomas de *E. coli*

(308) y de reticulocitos (309) forman complejos "in vitro" con poliU, poliUC y poliUG en presencia de Mg^{2+} y sin que sea necesaria la de donadores de energía. Varios ribosomas pueden unirse a una cadena de poliU, produciendo complejos semejantes a los polisomas (307-310). La unión se realiza a través de la subunidad ribosomal 30 S (311) y requiere la ausencia de helicidad intramolecular en el polirribonucleotido (311, 312). Esta parece ser la única condición necesaria para la formación de complejos "in vitro" que, por lo demás, carece de especificidad; al menos son las conclusiones obtenidas al utilizar RNA procedente de virus (306).

La unión del mRNA a ribosomas "in vivo" es, por el contrario, específica. Mangiarotti y Schlessinger (313) han encontrado que en un cultivo de *E. coli* la actividad específica del mRNA en los polisomas aumenta de forma lineal inmediatamente después de añadir al medio uridina- 3H . Los ribosomas, pues, se van uniendo al mRNA a medida que éste se sintetiza, lo que parece indicar que dicha unión se produce por el extremo 5' terminal del mRNA o sus proximidades.

Aunque, en la actualidad, está totalmente aclarada la participación del mRNA en la estructura polisómica, (314), no todo el mRNA celular se encuentra en tal estado. Existen, no obstante, diferencias funcionales entre el asociado a los ribosomas y el que pueda existir libre en el citoplasma. Mientras que en bacterias el mRNA más activo sedimenta con independencia de los ribosomas (315), en células de mamíferos lo hace junto con ellos (302). Es posible que la diferente morfología de los sistemas capaces de sintetizar el RNA en organismos procarióticos y eucarióticos sea responsable de este distinto comportamiento.

1.4.6.4. Degradación del mRNA. (*)

La vida media del mRNA de bacterias difiere de la encontrada en organismos superiores. Para el de *E. coli* se puede calcular un valor de 7-8 mi

(*) En el presente apartado se emplea el término "periodo de semidescomposición" para indicar el tiempo necesario para reducir a su mitad el número de moléculas de un mRNA dado y se habla de "vida media", \bar{t} , como el promedio de las vidas de cada una de las moléculas de mRNA.

$$\text{Así, } \bar{t} = \frac{1}{n_0} \int_0^\infty t \cdot dn, \text{ donde } n_0 \text{ es el número de moléculas}$$

de mRNA presentes a tiempo 0. Resolviendo la integral puede verse fácilmente que la vida media equivale a 1.44 veces el periodo de semidescomposición, suponiendo una cinética de primer orden para la degradación enzimática del mRNA.

nutos y es tan sólo de 3 en el de *B. subtilis* (306). En mamíferos la renovación del mRNA es más lenta. Noll y col (157) calcularon para el de hígado de rata un periodo de semidescomposición de 90 minutos, al que corresponde una vida media de 130 minutos, mientras que Trakatellis y col. (315) calculan una vida media de 40 minutos como máximo en adenocarcinoma de ratón.

Los datos a este respecto son, sin embargo, confusos, ya que Scherrer y col. (288) cifran en 3-4 horas la vida media del mRNA de animales y, en algunos casos particulares parece tener aún una vida media superior. Por ejemplo, los reticulocitos son capaces de seguir sintetizando hemoglobina aún después de varias horas de perder el núcleo, es decir, la posibilidad de biosintetizar más mRNA (175, 316). Este hecho se consideró privativo de las células especializadas en la producción de una especie proteica particular (317), pero Revel y Hiatt (318) demostraron la presencia de mRNA en células hepáticas hasta 18 horas después de la administración de actinomicina D, un inhibidor de la biosíntesis de RNA y Lazda y Starr (319) llegaron a idénticas conclusiones estudiando la síntesis de anticuerpos después del tratamiento con la misma droga. Una posible explicación de esta aparente ambigüedad puede ser que la estabilidad del mRNA dependa del tipo de proteína que sintetiza: los que llevan información genética para proteínas estructurales tendrían una vida más larga que los encargados de la síntesis de enzimas inducibles (320).

Por otra parte existen diferencias entre los mRNAs de distintos tejidos e incluso parece haberlas entre los que dirigen la síntesis de proteínas ácidas o básicas. Así, Cozzzone y Marchis-Mouren (321) encontraron que los mRNA de hígado de rata son más estables que los de páncreas y, además, los que sintetizan proteínas básicas tienen una vida media más larga que los que dirigen la síntesis de proteínas ácidas en ambos tejidos.

No hay diferencias de estabilidad, sin embargo, entre el mRNA citoplásmico y el asociado a los polisomas (318).

De los datos expuestos anteriormente (304, 313) parece deducirse que la degradación del mRNA ha de llevarse a cabo en la dirección 5' → 3'. Esto plantea una dificultad, pues no se ha encontrado en bacterias ninguna exonucleasa capaz de degradar al RNA a partir del extremo 5' terminal mientras que sí existen exonucleasas específicas del extremo 3' terminal. La unión a los ribosomas protege, sin embargo, al mRNA de la acción de estas últimas, al menos "in vitro" (322). Por otra parte, parece que los productos de degradación "in vivo" de mRNA son nucleosidos 5' difosfato, lo que

sugiere la participación de una polinucleotido fosforilasa en la destrucción del mRNA (323).

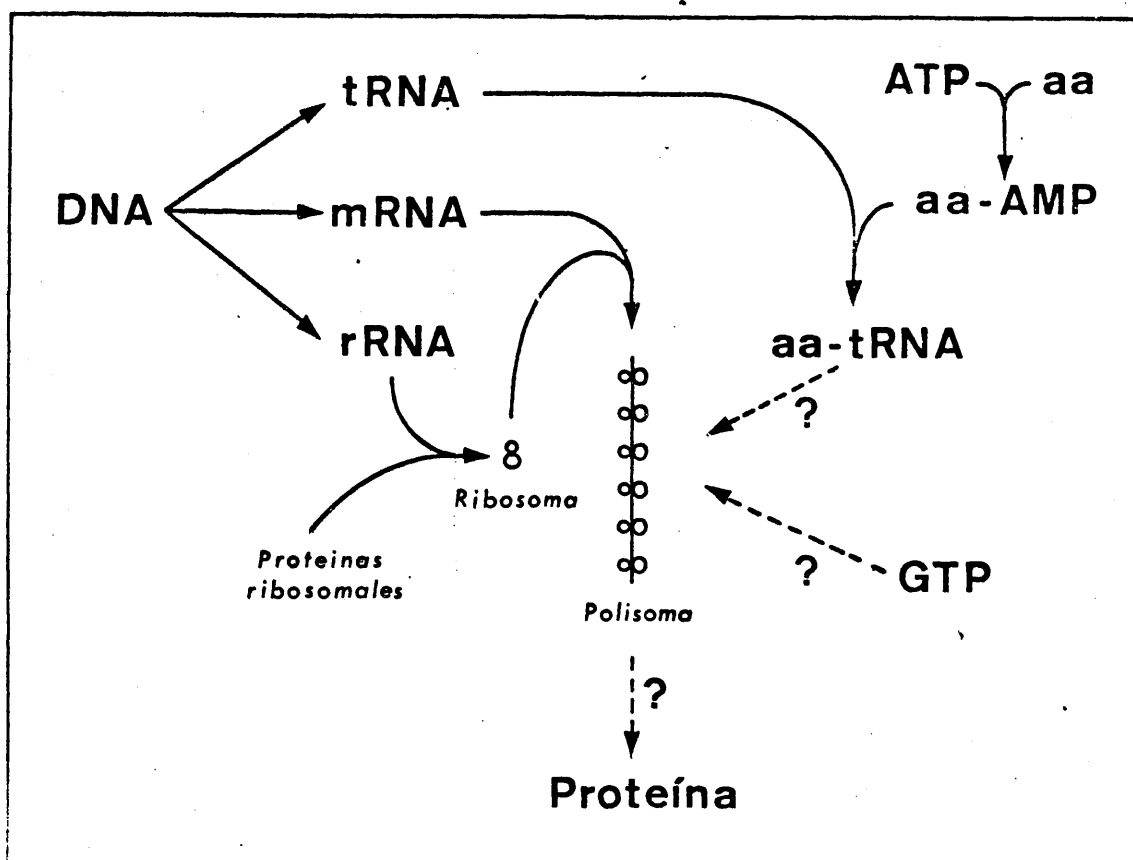


Figura 2

1.4.7. Formación del enlace peptídico.

La última fase de la biosíntesis de proteínas consiste en la formación del enlace peptídico entre los diferentes aminoácidos que, a través de sus correspondientes tRNA han sido ordenados según la secuencia del mRNA. La reacción transcurre sobre el ribosoma pero son varios los aspectos que hay que considerar en su mecanismo. En primer lugar será necesario estudiar de qué manera se une el aminoacil-tRNA al complejo ribosoma-mRNA para decir después el mecanismo de polimerización de aminoácidos y sus peculiaridades en cuanto a la iniciación y terminación de la cadena polipeptídica. Será también necesario estudiar el mecanismo íntimo por el que la secuencia del mRNA especifica la estructura primaria de las proteínas y el papel exacto del ribosoma en todos estos procesos.

La puesta a punto de sistemas acelulares capaces de biosintetizar proteínas a partir de aminoacil-tRNA (229, 239) ha constituido un arma valiosa para estudiar esta fase final de la incorporación de aminoácidos a proteínas. De esta manera ha podido ponerse de manifiesto que es en esta etapa donde es necesaria la presencia de GTP, por lo que pueden resumirse los datos comentados hasta el momento en el esquema de la figura 2.

1.4.7.1. *Transferencia de los aminoacil-tRNA al complejo ribosoma-mRNA.*

Las primeras experiencias de Nirenberg (292), además de constituir un apoyo indirecto de la hipótesis del "template" como se ha comentado en el apartado 1.4.6, tuvieron gran importancia por cuanto constituían el sistema acelular más simple capaz de realizar la síntesis de enlaces peptídicos. Teniendo en cuenta, además, que los complejos ribosoma-polinucleótidos sintéticos son semejantes a los polisomas, como se ha comentado (307-310), el sistema acelular de Nirenberg y Matthaei es -al menos potencialmente- una técnica apta para estudiar la unión del aminoacil-tRNA al polisoma.

Ya en 1963 pudo verse de esta manera que la unión "in vitro" del phe-tRNA^{phe} a los ribosomas de *E. coli* requería la presencia de poliU (324). Esta unión no es enzimática, pero sólo se produce si la concentración de Mg^{2+} en el medio es elevada y está presente, además, un catión monovalente, preferentemente NH_4^+ . Si se añaden enzimas y GTP a este sistema, comienzan a formarse enlaces peptídicos entre las distintas moléculas de fenilalanina (325). A semejantes resultados se llegó con ribosomas de reticulocitos y de hígado (326). Por otra parte, se ha constatado más recientemente que el acetilfenilalanil-tRNA^{phe} (ac-phe-tRNA) puede también fijarse al complejo ribosoma-poliU sin ningún requerimiento enzimático en presencia de Mg^{2+} 10mM (327).

Las condiciones en que se produce esta unión no enzimática no son, sin embargo, fisiológicas. Cuando la concentración de Mg^{2+} se aproxima a la normal en la célula de fijación de ac-phe-tRNA, por ejemplo, requiere GTP y una fracción enzimática (328), y si en lugar de emplear complejos ribosomas-poliU se utilizan polisomas naturales es siempre necesario el GTP y factores enzimáticos para que se lleve a cabo la unión del aminoacil-tRNA (329). En realidad, ya en 1961 se había apuntado la necesidad de factores enzimáticos en esta fase de la biosíntesis de proteínas (330) pero la falta de técnicas adecuadas impidió por entonces la localización exacta del requerimiento enzimático. Posteriormente se pudo detectar una diferencia entre la fijación no enzimática y la enzimática del phe-tRNA al complejo ribosomas-poliU. En el primer caso, sólo puede unirse a cada ribosoma

una molécula de phe-tRNA, mientras que en presencia de enzimas, GTP y una concentración salina fisiológica puede fijarse un segundo phe-tRNA (326).

La misión de las enzimas en la fijación de los aminoacil-tRNA al polisoma no puede, sin embargo, separarse totalmente de su papel en la iniciación de la cadena polipeptídica y en el crecimiento de la misma, por lo que su estudio se hará conjuntamente.

1.4.7.2. Factores enzimáticos requeridos para la polimerización de aminoácidos.

En 1964 Allende y col. (331) aislaron a partir de la fracción soluble de *E. coli* dos factores, separables por cromatografía en DEAE-celulosa, necesarios para la polimerización de fenilalanina en presencia de poliU. Uno de ellos, factor G, exhibe, en presencia de ribosomas, actividad de GTPasa (331,332). Posteriormente, Nishizuka y Lipmann perfeccionaron la separación de ambos factores (333) e investigadores del mismo grupo consiguieron separar el segundo factor en dos fracciones, una estable, T_s, y otra inestable, T_u (334). Tanto el factor G como los T se han conseguido cristalizar recientemente (335-337).

Para la fijación de Phe-tRNA sobre el complejo ribosoma-poliU cargado no enzimáticamente con ac-Phe-tRNA se requiere la presencia simultánea de GTP y el factor T, así como la integridad del ribosoma (338) pero el factor T, antes de entrar en contacto con el ribosoma da lugar a un complejo previo T-GTP-aminoacil-tRNA (339). En la formación de este complejo se consume un mol de GTP por mol de tRNA (340) siendo indispensable la aminoacilación de este último para que la reacción transcurra (339).

1.4.7.3. Naturaleza de las interacciones tRNA-ribosoma.

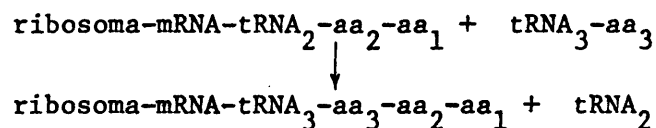
La integridad del ribosoma es necesaria para la fijación funcional del aminoacil-tRNA pero no para una simple fijación inespecífica. Ya en 1963 se pudo comprobar la existencia de una asociación "in vitro" del aminoacil-tRNA con la subunidad 50 S de ribosomas bacterianos aún en ausencia de mRNA (341). En la actualidad, y a pesar de ciertos resultados aparentemente contradictorios (342, 343) se admite que en el complejo funcional ribosoma-mRNA-aminoacil-tRNA este último se fija selectivamente sobre la subunidad ribosomal mayor, aunque, naturalmente, su anticodon estará en contacto con el mRNA y, por tanto, en las proximidades de la subunidad menor. Si bien las primeras experiencias de Cannon y col. parecían sugerir la participación de la secuencia terminal CCA de los tRNAs en tal fijación (341), los resultados de Takanami y Miura (344) indican que la interacción tiene

lugar en otra zona del tRNA. Ya que tal interacción es común a todos los tRNA se ha postulado que tiene lugar a través de la secuencia común G T ψ C. En favor de esta hipótesis se encuentra el hecho de que exista una secuencia complementaria en el rRNA 5 S (134), que como se ha comentado, pertenece a la subunidad ribosomal mayor. Si esto es así, la proximidad espacial de las secuencias G T ψ C y C C A que exige el modelo de Cramer (272) podría explicar la contradicción entre los resultados de Cannon y col. (341) y Takanami y Miura (344).

1.4.7.4. Crecimiento de la cadena polipeptídica.

En 1961 Lyman demostró, basándose en las características moleculares del ribosoma y del tRNA, la imposibilidad de que durante la biosíntesis de una molécula proteica se encuentren simultáneamente todos los aminoacil-tRNA sobre el ribosoma (345). Es pues necesaria una entrada secuencial de los distintos aminoacil-tRNAs al ribosoma, de forma que, una vez formado el enlace peptídico, el tRNA libre abandone la zona de síntesis del mismo.

Gilbert pudo demostrar en 1963 que durante todo el proceso de biosíntesis de proteínas la cadena polipeptídica permanece unida al mRNA a través de una sola molécula de tRNA (310). De esta forma podría pensarse que el crecimiento de la proteína tiene lugar según el siguiente esquema:



Por otra parte, el ribosoma sólo puede estar en contacto simultáneamente con unas 27 bases del mRNA (346), por lo que es evidente que ha de moverse a lo largo del mRNA durante el proceso de biosíntesis de una proteína, o bien es el mRNA el que debe avanzar a lo largo del ribosoma. En el caso de los polisomas cada uno de los ribosomas constituyentes puede estar sintetizando simultáneamente proteína, aunque, como es obvio, la longitud de la cadena será mayor en los ribosomas que se encuentren más lejos del principio del mRNA. De esta manera se justifica el que los polisomas sean más activos que los ribosomas monoméricos en la biosíntesis de proteínas y, además se puede encontrar una explicación a la relación entre el tamaño del polisoma y el de la proteína que sintetiza, ya que este último depende de la longitud del mRNA.

Considerando todos los datos anteriores, Zamecnik postuló en 1966 que en la subunidad mayor de los ribosomas debería haber dos centros de fija-

ción de tRNA: uno de ellos sería específico del peptidil-tRNA y otro del nuevo aminoacil-tRNA (278). Una vez formado el siguiente enlace peptídico el nuevo peptidil-tRNA habría quedado en el sitio correspondiente al aminoacil-tRNA, por lo que sería necesaria una translocación que podría estar asociada con la del ribosoma sobre el mRNA. Recientemente se ha comprobado, con ribosomas de reticulocitos de conejo, la hipótesis de Zamecnik, si bien se ha podido descubrir la existencia de un tercer sitio de unión que permite una fijación previa del aminoacil-tRNA antes de que éste pase al sitio de formación del enlace peptídico (347).

En 1966 Nishizuka y Lipmann (333) estudiaron la estequiometría de la síntesis del enlace peptídico llegando a la conclusión de que se consumía una molécula de GTP en la formación de cada uno. El papel de este donador de energía, que se escinde en GDP y fosfato inorgánico (332) se asoció pronto con la translocación del ribosoma (320).

Con los datos expuestos hasta el momento, puede vislumbrarse el mecanismo del crecimiento de la cadena polipeptídica. Las experiencias realizadas en un sistema dirigido por poliU (apartado 1.4.7.1) pueden explicarse a base de una fijación del acetil-fenilalanil-tRNA sobre la zona del ribosoma correspondiente al peptidil-tRNA (zona P), mientras que el segundo fenilalanil-tRNA llega a la zona aceptora del aminoacil-tRNA (zona A) en presencia de GTP y los dos factores T_s y T_u . Si bien estos factores estimulan en tal sistema la formación de acetil-fenilalanil-fenilalanil-tRNA (348), ni ellos ni el GTP son necesarios para que actúe la peptidil sintetasa (338). La formación del enlace peptídico es pues una consecuencia inmediata a la ocupación de la zona A por un nuevo aminoacil-tRNA, fase que, como se acaba de ver, sí requiere la presencia de factores T y GTP. A las mismas conclusiones se ha llegado con un sistema procedente de mamíferos (349) y, recientemente, se ha comprobado totalmente este mecanismo (350).

Una vez formado el enlace peptídico, el peptidil-tRNA queda sobre la zona A del ribosoma. Ahora bien, para que pueda tener lugar un nuevo alargamiento de la cadena ha de pasar a la zona P y este desplazamiento debe implicar que el siguiente codon del mRNA se enfrente a la zona A. Es en este momento en el que juega su papel el factor G (351), que también requiere GTP para su actuación. Los resultados experimentales concuerdan con el modelo hipotético que habían propuesto Nishizuka y Lipmann en 1966 (352). El crecimiento de las cadenas polipeptídicas supone una translocación del peptidil-tRNA de la zona A a la P después de cada formación de un nuevo en

lace. El tRNA que había quedado libre sobre la zona P abandona previamente la misma y un nuevo aminoacil-tRNA pasa a ocupar la zona A, todo ello acompañado por un cambio de posición relativa del mRNA. El GTP es pues necesario en dos momentos: la fijación de un nuevo aminoacil-tRNA y la translocación subsiguiente a la síntesis del enlace peptídico. Así pues el ribosoma está lejos de ser un mero soporte pasivo de la biosíntesis de proteínas y, con su translocación permite la síntesis de sucesivos enlaces peptídicos.

Es difícil, no obstante, explicar esta translocación en términos moleculares. Recientemente Hill (353) ha sugerido que es consecuencia de una modificación configuracional del ribosoma que sigue un mecanismo alostérico en el que el GTP actúa como efector. De hecho, los cambios de configuración del ribosoma están comprobados hoy día y se ha puesto de manifiesto su importancia en la traducción del mensaje genético gracias a los trabajos de Sherman y Simpson. Estos autores han comprobado que la estreptomicina -que como se verá más adelante produce alteraciones en la traducción (apartado 1.4.9.2,a)- actúa a nivel molecular provocando un cambio conformacional del ribosoma, detectable por las diferencias en el intercambio $H-^3H$ en presencia y ausencia del antibiótico (354). De todas formas la falta actual de información sobre la arquitectura molecular del ribosoma y la funcionalidad de sus proteínas impide progresar más en el estudio de la translocación del mismo.

1.4.8. El código genético.

Como se ha comentado anteriormente, en 1961 se había llegado al convencimiento de que la posición de cada aminoácido en la proteína venía especificada por un triplete de bases (codon) del mRNA. Este hecho planteaba una cuestión inicial: dado que son cuatro las bases que componen el mRNA son posibles 64 (4^3) tripletes distintos, mientras que sólo existen 20 aminoácidos diferentes en las proteínas. Cada aminoácido puede estar pues especificado por más de un triplete (degeneración o redundancia del código). Por otra parte, ya que se conocen muchas proteínas de mutantes que sólo difieren de la original en un aminoácido, los tripletes no deben solaparse en el mRNA. Así se justifica que una mutación sobre el material genético que afecte una sola base se traduzca en un único aminoácido alterado sobre la proteína (269).

El desciframiento del código genético, es decir, la búsqueda de los codones correspondientes a cada aminoácido, se convirtió pronto en uno de los principales problemas de la Biología Molecular. Las experiencias de Nirenberg y Matthaei (292), varias veces apuntadas en líneas anteriores, permi-

tieron asignar el codon UUU a la fenilalanina. A partir de este momento el sistema de síntesis dirigida por polinucleotidos sintéticos se convirtió en una forma de investigar el código genético. Así Gardner y col. pudieron comprobar que el poliA estimulaba la síntesis de polilisina, asignando el codon AAA a la lisina (355). Análogamente el poliC dirige la síntesis de poliprolina (292, 356), aunque su eficacia es muy inferior a la de los polinucleotidos anteriores.

El siguiente paso en la investigación fue utilizar polinucleotidos obtenidos por copolimerización de dos o más nucleotidos, en incubaciones sucesivas en las cuales uno solo de los 20 aminoácidos estaba marcado isotópicamente. La asignación de triplete en este caso está basada sobre un estudio de la probabilidad de que en un copolímero al azar se encuentren adyacentes las tres bases que lo componen.

Posteriormente el grupo de Khorana (357) consiguió poner a punto la síntesis de polinucleotidos de secuencia alternante, tales como el poliU (UCUCUC...), poliUG, poliAC y poliAG. En todos los casos, estos polinucleotidos daban lugar a polipéptidos constituidos exclusivamente por dos aminoácidos (358, 359) lo que demostraba de modo inequívoco que los codones no podían estar constituidos por un número par de bases. Además, admitiendo que eran tripletes, se llegó a la asignación de varios de ellos.

Todo el cúmulo de experiencias que, realizadas con polinucleotidos sintéticos, condujeron al conocimiento de gran parte de los codones entre los años 1961 y 1965, se deben fundamentalmente a los grupos de Nirenberg, Khorana y Ochoa y han sido revisadas ampliamente en numerosas ocasiones (317, 360, 361).

La dilucidación de la secuencia exacta de bases dentro de cada codon era, sin embargo, un problema sólo resuelto en casos muy particulares hasta los importantes trabajos de Nirenberg y Leder (362). Estos autores encontraron que un aminoacil-tRNA no sólo puede unirse "in vitro" a los ribosomas en presencia de polinucleotidos como se ha comentado, sino que también los trinucleotidos del tipo XpYpZ pueden favorecer esta unión. Los dinucleotidos son ineficaces en la fijación del tRNA sobre el ribosoma, lo que, una vez más, confirma la estructuración en tripletes del código genético. Pero la trascendencia de este trabajo estriba en el hecho de que no sólo permite confirmar la composición de los codones asignados con polinucleotidos, sino descubrir la secuencia de ellos, ya que un aminoacil-tRNA sólo se fija al ribosoma en presencia del trinucleotido que constituye su codon. Para facilitar el estudio de esta reacción de fijación se mezclan ribosomas, un trinucleotido y una mezcla de los aminoacil-tRNA de entre los cuales uno está

marcado isotópicamente en el resto aminoácido. La mezcla de reacción se pasa por membranas filtrantes que retienen los ribosomas y el aminoácil-tRNA fijado, mientras que los demás pueden eliminarse mediante sucesivos lavados.

En la tabla V se recoge la estructura del código genético obtenida a partir de los ensayos con polinucleótidos y de los datos suministrados por la unión de aminoácil-tRNAs a ribosomas en presencia de trinucleótidos (363-365).

TABLA V
CODIGO GENETICO

	U	C	A	G	
U	phe	ser	tyr	cys	U
	phe	ser	tyr	cys	C
	leu	ser	term.	term.	A
	leu	ser	term.	try	G
C	leu	pro	his	arg	U
	leu	pro	his	arg	C
	leu	pro	gln	arg	A
	leu	pro	gln	arg	G
A	ile	thr	asn	ser	U
	ile	thr	asn	ser	C
	ile	thr	lys	arg	A
	met	thr	lys	arg	G

La primera columna de la izquierda representa la primera base del codon, la fila superior la segunda y la última columna de la derecha la tercera.

Recientemente Grunnberger y col. (366) han comprobado la validez de las asignaciones de codones por el método de los trinucleótidos al demostrar que un phe-tRNA^{val} sólo es capaz de fijarse al ribosoma en presencia de tripletes correspondientes a la valina.

En la tabla V puede observarse la inexistencia de ambigüedad en el código genético (ningún triplete especifica simultáneamente a más de un aminoácido). Por el contrario existe degeneración o redundancia, ya que un solo

aminoácido puede poseer varios codones de acuerdo con las predicciones iniciales. Conocida la heterogeneidad de los tRNAs de varios aminoácidos (apartado 1.4.5.2.) era lógico pensar que tuviera alguna relación con la redundancia del código, es decir, que los distintos tRNAs específicos de un aminoácido difiriesen en sus codones (242). De hecho ya en 1963 se había encontrado que la biosíntesis de polileucina a partir de los distintos leu-tRNA^{leu} era dirigida por diferentes polinucleótidos (228). Weisblum y col. (229) incluso demostraron una incorporación diferencial de leucina en las cadenas α y β de la hemoglobina a partir de leucil-tRNA^{leu}_I y leucil-tRNA^{leu}_{II}.

Sin embargo, no es general el que a cada codon corresponda un tRNA diferente. Por ejemplo, el fenilalanil-tRNA capaz de unirse a UUU también lo hace a UUC (367). Así pues se vio la necesidad de estudiar más a fondo las interacciones codon-anticodon para comprender el por qué de esta aparente falta de especificidad. Más aún, a la vista de las secuencias conocidas de tRNAs se puede llegar a la construcción de la tabla VI en la que se aprecian claramente algunas ambigüedades en el reconocimiento de la tercera base del codon. Estas observaciones fueron generalizadas por Söll y col. aún

TABLA VI
ANTICODONES DE ALGUNOS tRNA

<u>Aminoácido</u>	<u>Anticodon</u>	<u>Posibles codones</u>
Serina	IGA	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Tirosina	G Ψ A	UAU, UAC
Valina	IAC	GUU, GUC, GUA, GUG
Metionina	CAU	AUG
Alanina	IGC	GCU, GCC, GCA, GCG
Fenilalanina	*GAA	UUU, UUC

Con el símbolo Ψ se representa el ácido o-metil-guanidílico.

antes de conocerse la mayoría de los anticodones (368) y condujeron a que Crick postulase una hipótesis sobre el reconocimiento de la tercera base del codon (369). En la tabla VII se recogen las posibilidades de apareamiento que, según Crick, existen entre la base 3' terminal del codon y la 5' terminal del anticodon.

De esta manera puede justificarse la redundancia del código genético sin necesidad de tener que acudir a tantos tRNAs como codones, aunque sigan

TABLA VII

POSIBILIDADES DE INTERACCION CODON-ANTICODON

<u>Base 5' terminal del anticodon</u>	<u>Bases 3' terminales que puede reconocer en el codon</u>
U	A G
C	G
A	U
G	U C
I	U C A

oscuras las causas por las que el apareamiento de la tercera base del codon no sigue estrictamente el modelo Watson-Crick.

1.4.9. Iniciación y terminación de la traducción.

1.4.9.1. *Dirección de la traducción.*

La biosíntesis de proteínas comienza por el extremo N terminal. Dintzis y col. pudieron demostrarlo en una serie de trabajos en los que estudiaban la distribución de la radiactividad en péptidos procedentes de la hidrólisis con tripsina de proteínas específicas sintetizadas durante exposición a breves marcajes con aminoácidos-¹⁴C y tritiados. (370-372).

Así pues, para decidir la dirección en que tiene lugar la traducción, bastaba averiguar qué extremo del mRNA corresponde al N-terminal de la proteína. Aunque han sido numerosos los trabajos realizados para investigar esta cuestión, los primeros fueron poco concluyentes cuando no contradictorios. En 1966 Guest y Yanofsky (373) basándose en estudios genéticos sobre el sistema de biosíntesis de triptófano sintetasa en E. coli llegaron a establecer una traducción en la dirección 5' → 3' del mRNA. En el mismo año el grupo de Ochoa llegó a la misma conclusión por un camino distinto. Al utilizar oligonucleotidos del tipo A₅CA_n (ApApApApApCpAp.....ApA) y un sistema acelular bacteriano se sintetizan polipéptidos que contienen lisina (codon AAA), asparagina (AAC) y sólo trazas de treonina (ACA) en los cuales la asparagina se encuentra en el extremo N-terminal. Si el oligonucleotido es del tipo A₄CA_n el polipéptido está formado por lisina, treonina y trazas de asparagina y la treonina ocupa la posición N-terminal (374). Los resultados

demuestran claramente que la dirección de traducción es $5' \rightarrow 3'$. El mRNA s traduce, pues, en la misma dirección en que se sintetiza, lo que permite, en principio, que la traducción comience aún cuando no se haya completado la transcripción.

1.4.9.2. *Iniciación de la biosíntesis de proteínas.*

Las primeras experiencias realizadas con polinucleótidos como mensajeros artificiales parecían indicar que la iniciación de la biosíntesis de proteínas no requería más que la presencia concomitante de ribosomas, mRNA, aminoacil-tRNAs y los cofactores y enzimas ya conocidos. Con poliA, el polipéptido resultante está constituido exclusivamente por lisina y no parecía existir ninguna señal específica para el comienzo de la polimerización. Algunos hechos, sin embargo, arrojaban un punto de duda sobre la validez general de estas observaciones. En primer lugar la consideración de la diversidad de zonas ribosomales implica que, de no existir un mecanismo especial de iniciación, ambas zonas, A y P, estén ocupadas por aminoacil-tRNAs antes de la formación del primer enlace peptídico. Por otra parte, la incorporación diferencial "in vitro" de phe-tRNA y ac-phe-tRNA al complejo ribosoma-poliU (apartado 1.4.7.1) sugiere la acomodación preferente del ac-phe-tRNA en la zona P, quizá favorecida por el bloqueo del grupo NH_2 del resto fenilalanilo. De hecho, se ha demostrado que en tal sistema la polifenilalanina sintetizada está acetilada en su NH_2 terminal (375). Pero las evidencias más fuertes a favor de un mecanismo especial de iniciación surgieron como consecuencia de los trabajos de Marcker y col. En 1964 encontraron una diferencia funcional entre los dos tRNA^{met} separables por distribución en contracorriente (apartado 1.4.5.2). Sólo el metionil- $\text{tRNA}_F^{\text{met}}$ puede formarse "in vivo" e "in vitro" dando origen a N-formilmetionil-tRNA (fmet-tRNA) (376). A partir de este resultado se emitió la hipótesis de que el metionil- tRNA_M , que no es capaz de formarse, es el encargado de situar la metionina en las posiciones internas de la proteína, mientras que el metionil- tRNA_F actúa sólo como iniciador de su biosíntesis. Se ha comprobado que los dos metionil-tRNAs pueden unirse "in vitro" al trinucleótido AUG, pero el met- tRNA_F se une también a los tripletes UUG y GUG. Puede pensarse que esto representa -al menos "in vitro"- una ambigüedad, ya que estos codones son propios de leucina y valina, respectivamente. Sin embargo, las condiciones de fijación del met- tRNA_F a dichos tripletes son diferentes en cuanto a concentración salina de la unión de leu-tRNA o val-tRNA (377,378). Nuevamente se encuentra que una diferencia en la concentración de Mg^{2+} puede ser decisiva

a la hora de la iniciación de una cadena polipeptídica "in vitro".

Noll, a la vista de estos resultados, sugirió que la formilación del aminoácido N-terminal era necesaria para la iniciación de la biosíntesis de proteínas (379) pero en la actualidad se piensa que -al menos en E. coli- la traducción comienza siempre por un met-tRNA_f que puede estar formilado o no. Alguna peculiaridad estructural del tRNA_f permite su fijación a la zona P del ribosoma (379), por lo que actúa exclusivamente como iniciador. Esta hipótesis se vio reforzada por los trabajos de Adams y Capecchi (380) que fueron capaces de demostrar una secuencia N-terminal fmet-ala-ser-asn... en las proteínas sintetizadas por un sistema acelular de E. coli en presencia de RNA del fago f2, mientras que la secuencia correspondiente a las proteínas de su cápsida normal es ala-ser-asn...

No obstante, no todas las proteínas de E. coli comienzan por metionina. Este aminoácido representa sólo un 40% de los N terminales (381) y en ningún caso está formilado (377). Es pues necesario que exista un mecanismo capaz de desformilar e incluso de eliminar totalmente la metionina después de sintetizada la proteína.

Casi simultáneamente a estas experiencias Ochoa y col. (382) aislaron y purificaron parcialmente a partir de E. coli dos factores enzimáticos que estimulaban la unión al ribosoma de met-tRNA_f, como se pudo comprobar con polinucleótidos sintéticos que poseían una secuencia AUG en las proximidades del extremo 5' terminal. En 1968 se pudo demostrar que se trataba en realidad de tres factores, A, B y C, separables por cromatografía en DEAE-celulosa (383). Actualmente se piensa que estos factores son necesarios para la formación inicial del complejo ribosoma-mRNA-fmet-tRNA_f. Incluso parece ser que, en ausencia de fmet-tRNA y factores de iniciación, los ribosomas de E. coli están escindidos en subunidades (salvo los que forman parte de polisomas) (384. 385) y su unión -y por tanto su posibilidad de actuación- sólo tiene lugar en presencia de aquellos.

1.4.9.3. Terminación de la cadena polipeptídica.

Un mRNA puede dirigir la síntesis de una sola proteína (mensaje monocistrónico) o de varias proteínas relacionadas (mensaje policistrónico). En el segundo caso es evidente que debe existir entre el codon correspondiente al extremo C-terminal de una proteína y el del extremo N-terminal de la siguiente una señal que impida el establecimiento de enlace peptídico para asegurar la individualidad de las distintas moléculas proteicas. Pero no basta con asegurar la terminación de las proteínas. Se ha visto que duran-

te su crecimiento permanecen unidas al ribosoma y al mRNA a través de un tRNA, por lo que es necesario que, de alguna manera, al terminar la traducción del mensaje la proteína se separe del último tRNA y, por tanto, del aparato biosintético. Esta separación ha de ocurrir con independencia de que el mRNA sea mono o policistrónico.

Se pensó pues que existiría algún codon capaz de llevar a cabo esta liberación y que estaría situado al final de cada cistron.

A partir de análisis genéticos de las mutaciones "ocre" y "ámbar" que se dan con cierta frecuencia en *E. coli* y en colífagos, Brenner y col. (386-388) y Weigert y Garen (389, 390) llegaron a la conclusión de que el codon UAA cumplía esta misión. Los codones UAG y UGA tienen también un papel semejante (391, 392).

Además de los análisis genéticos, las técnicas de formación de complejos con trinucleótidos y los estudios con polinucleótidos sintetizados a partir de esas bases han concurrido para poner de manifiesto de tales codones como terminadores. Ninguno de ellos promueve la incorporación de aminoácidos y si la liberación de polipéptidos (363, 393). Esta liberación no es frecuente en los ensayos realizados con polinucleótidos. Al incubar con poliU, por ejemplo, la mayor parte de la polifenilalanina permanece unida al tRNA (394).

No existe ningún tRNA capaz de unirse a los codones de terminación (395) pero en 1967 Capecchi pudo poner de manifiesto que es necesaria una proteína para que se lleve a cabo la liberación de la cadena polipeptídica mediante el codon UAG (396). Nirenberg ha puesto a punto un sistema sencillo para demostrar la participación de la proteína de Capecchi en la terminación de la cadena. Para ello se forma el complejo ribosoma-AUG-fmet-tRNA_f y se estudia la hidrólisis de formilmetionil-tRNA en presencia de cualquiera de los tripletes de terminación. Así ha demostrado que el factor proteico acelera la hidrólisis de formilmetionil-tRNA (397) y, posteriormente, ha conseguido separar en dos componentes, R_1 y R_2 , el factor de Capecchi (398). Los dos son capaces de hidrolizar el formilmetionil-tRNA unido al ribosoma en presencia de UAA, pero el R_1 es capaz de hacerlo además con UAG y el R_2 con UGA.

Con todos estos datos se supone en la actualidad que el codon normal para la terminación "in vivo" es UAA, mientras que los otros dos se utilizan con menos frecuencia.

1.4.10. Universalidad del mecanismo propuesto.

Como se ha comentado repetidas veces a lo largo del estudio precedente, la mayor parte de las experiencias realizadas para dilucidar el mecanismo de la biosíntesis de proteínas lo han sido con bacterias. Esto no es obstáculo para que -dadas las numerosas aunque minoritarias experiencias llevadas a cabo con otros sistemas- pueda concluirse que, al menos en sus líneas generales, el mecanismo propuesto, incluida la estructura del código genético, es universal.

Unicamente en lo que respecta a la iniciación y terminación de cadenas son aún escasos los datos referentes a sistemas no bacterianos, aunque no hay contradicción alguna para pensar que, existe en mamíferos un mecanismo semejante al encontrado en bacterias.

1.4.11. Regulación de la biosíntesis de proteínas.

Todas las células que derivan de una célula única poseen la misma dotación genética, excepción hecha de los cambios producidos por mutaciones no letales -estadísticamente muy escasos- que hayan podido ocurrir espontáneamente en su formación. Es suficientemente conocido, por otra parte, el hecho de que en todas las células existe un exceso de información genética. Si esto es cierto en organismos unicelulares, es aún más relevante en los pluricelulares, ya que la diferenciación de tejidos implica la transcripción de sólo unas partes determinadas de genoma.

Pero además de esta transcripción diferencial, que por supuesto se refleja en una traducción desigual en los diferentes tejidos de un organismo pluricelular, es necesario tener en cuenta que, en un momento dado, una célula no sintetiza todas las proteínas que es capaz. La síntesis de proteínas, de ordinario, no procede al azar, sino que está regulada. Es decir, cada célula sintetiza por lo general sólo las proteínas que necesita -y en la proporción que las necesita- en un momento preciso.

Los procedimientos por los que esta regulación se lleva a cabo son de muy variada naturaleza. Dejando de lado los mecanismos de regulación de transcripción inherentes a la diferenciación en organismos pluricelulares, pueden considerarse en primer lugar los que implican la actuación de genes reguladores y, después, la regulación ejercida a nivel de tRNA. La mayor parte de los estudios de regulación se han realizado con bacterias pero en organismos pluricelulares el proceso es aún más complejo, ya que es necesario considerar una regulación de origen extratisular, que se ejerce fundamentalmente a través de la acción hormonal.

1.4.11.1. Genes reguladores.

Según la terminología fijada por Riley y Pardee en 1962 (399) se suelen denominar genes estructurales los que se transcriben en el mRNA que determina la estructura primaria de una enzima o proteína estructural. Una mutación en un gen estructural conduce a una anormalidad en la proteína sintetizada. Pero pronto se pudo detectar que mutaciones producidas en algún locus distinto del gen estructural pueden influir en el producto de éste o en la velocidad de su síntesis. Existen pues otros genes específicos de cada proteína, los cuales, junto con el estructural reciben el nombre de genes primarios para distinguirlos del resto de los genes, no específicos o secundarios, que no se transcriben en mRNA y dan origen a los demás tipos de RNA (*).

Algunos genes estructurales son inducibles o reprimibles, es decir, su velocidad de expresión no es invariable, sino dependiente del estado metabólico de la célula. Ordinariamente, en el caso de genes estructurales propios de una enzima, los sustratos suelen ser inductores (aumentan el nivel de la biosíntesis), mientras que los productos finales suelen reprimir la síntesis de la enzima (400).

Apoyándose en numerosos estudios genéticos Jacob y Monod elaboraron en 1961 su conocida hipótesis para explicar la inducción o represión de la síntesis de enzimas (283). En grandes rasgos, la hipótesis admite la existencia de un gen regulador, R, cuyo producto inhibe la transcripción o traducción del gen estructural. El inductor inactiva el producto del gen regulador, permitiendo así la síntesis de proteínas, mientras que el represor lo activaría, dando origen a la detención del proceso biosintético. Así, una mutación en el gen R puede conducir a una diferencia cuantitativa en la expresión del gen estructural, aunque la proteína producida sea normal.

En 1959 Ames y Garry (401), al estudiar desde un punto de vista genético las enzimas encargadas de la biosíntesis de histidina en Salmonella, encontraron por una parte que sus correspondientes genes estructurales están contiguos y, por otra, que existe una inducción o represión coordinada de todas ellas, Jacob y Monod estudiaron también este sistema y detectaron mutaciones que no se producían en los genes estructurales ni en el regulador y sin embargo afectaban la síntesis de las enzimas (283). A partir de estos

(*) Algunos autores incluyen entre los "genes secundarios" los que especifican la síntesis de aminoácido: tRNA ligasas.

trabajos se llegó a la idea de que los genes que dirigen la síntesis de enzimas relacionadas (por estar implicadas en un mismo proceso metabólico) se encuentran juntos y existe además un gen adicional (operador, O) cuya respuesta al producto del regulador afecta a todos los genes estructurales. Este conjunto de genes estructurales y operador se denomina operón (402). Así, en presencia del inductor el producto del gen regulador no actúa sobre el operador y permite la traducción del mensaje genético. Sin embargo el producto del gen regulador activado por el represor es capaz de bloquear el operador e impedir la expresión de los genes estructurales. El operador, a diferencia del regulador se encuentra adyacente a la serie de genes estructurales e incluso puede solapar o coincidir con el primero de ellos (403). En la figura 3 se esquematiza el mecanismo de regulación de un operón.

El mecanismo de acción del operador no está aún aclarado. Su papel se ha comparado al de una "cerradura genética" que bloquea el resto del operón (404) pero no está claro el modo íntimo por el que se produce este bloqueo.

Salvo en los casos en que el operador está superpuesto al primer gen estructural no parece que de origen a ningún producto proteico.

Son más abundantes los datos que conciernen al producto del gen regulador. Garen y col. (405, 406) y Gallant y Stapleton (407) demostraron que el producto del gen regulador correspondiente al estructural de la fosfatasa alcalina de E. coli era una proteína. En este sentido el gen regulador funciona realmente como un gen estructural, por cuanto se traduce también, aunque su misión es claramente distinta. La naturaleza proteica -al menos en parte- del producto del gen regulador se ha puesto de manifiesto no sólo en el caso de genes estructurales únicos sino también en el de operones como el de la β -galactosidasa y el de la lactosa (408). La activación o inactivación de este producto proteico parece ser consecuencia de un mecanismo alostérico (409, 410).

En este momento cabe replantear la cuestión de si una proteína capaz de inhibir la expresión genética actúa -después de su modificación alostérica en presencia del represor- a nivel de la transcripción o de la traducción. Es necesario hacer mención de los trabajos de Stent (411) que condujeron a la idea de que en bacterias, en condiciones normales, el mRNA naciente es retirado del DNA por unión a los ribosomas para formar el polisoma. Existe así un complejo DNA-RNA polimerasa-mRNA-ribosoma que concuerda con la necesidad de una síntesis concomitante de mRNA y proteínas propuesta por Pardee y Prestidge (412) y cuya posibilidad se ha puesto de manifiesto

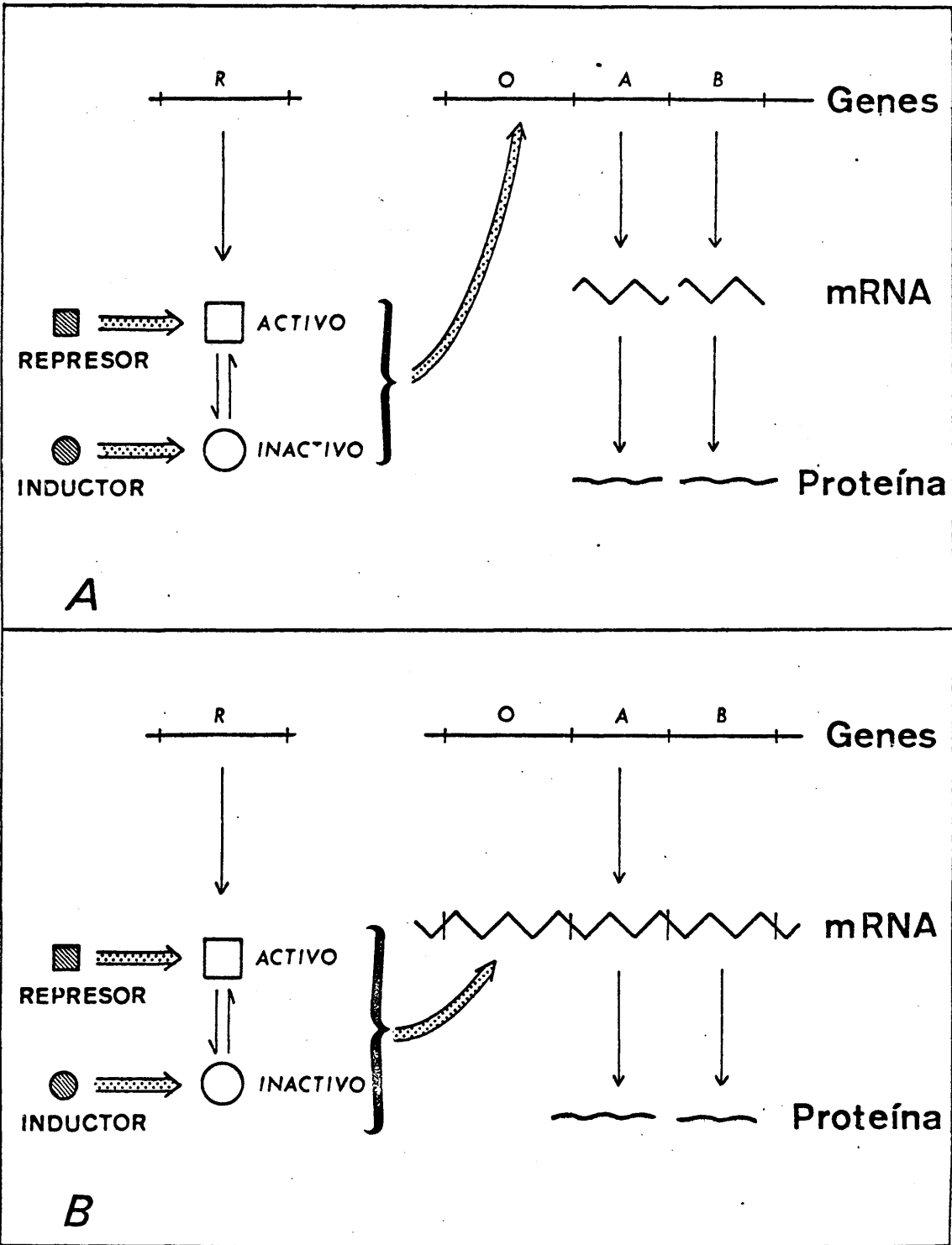


FIGURA 3.- Regulación de la biosíntesis de proteínas. A: mensaje monocistónico. B: mensaje policistónico.

en el apartado 1.4.7.6. A la vista de estos datos se piensa preferentemente en un control alostérico a nivel del polisoma (408, 413).

1.4.11.2. Regulación a nivel de tRNA.

El operón de la histidina en *Salmonella* se ha utilizado extensamente como base de estudios genéticos moleculares de regulación (402). Gracias a ello se conocen mutaciones que afectan a los mecanismos de regulación, de las cuales cuatro dan origen a cepas con un elevado contenido en enzimas correspondientes a la biosíntesis de histidina. A partir de investigaciones sobre mutantes de este tipo Roth y col. (414) propusieron que la regulación de la expresión del operón "his" tiene lugar a nivel de la traducción de un mRNA policistrónico. Son varios los datos que pueden confirmar esta teoría y, de otra parte, poner de manifiesto la función del tRNA^{his} en dicha regulación. El mRNA policistrónico se traduce a partir del extremo correspondiente al operador (415) y su iniciación está controlada por un codón de histidina situado en el operador, de forma que el histidil-tRNA bloquea la traducción, mientras que el tRNA^{his} libre la permite (416), con lo que la presencia de histidina favorece en definitiva la detención de las enzimas de su biosíntesis.

Vogel y col. (véase ref. 408) han estudiado la regulación de la biosíntesis de acetilornitina- δ -transaminasa de *E. coli*, una enzima que cataliza el cuarto paso de la biosíntesis de arginina, y han llegado a la conclusión de que el producto del gen regulador es un análogo de tRNA que ejerce su acción reguladora a nivel de traducción, reconociendo algún codón que deriva del gen operador.

Recientemente Anderson (417) ha investigado la influencia de la concentración de tRNA sobre la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares. La conclusión más interesante de su trabajo es que la fracción de tRNA^{arg} que reconoce los codones AGA y AGG origina una traducción más lenta "in vivo" que la que corresponde a los tRNA^{arg} específicos de otros codones. Así pues los tripletes AGA y AGG pueden tener una función reguladora en la fase de traducción en *E. coli* (aunque de naturaleza distinta a las consideradas hasta ahora). Algo parecido sucede en mamíferos. Por lo menos se ha demostrado que en la síntesis de hemoglobina de conejo la participación de las diferentes fracciones del tRNA específico de un aminoácido es desigual en las dos cadenas (418).

Puede pues concluirse que, aunque en general tenga validez el esquema de regulación de Jacob y Monod la actuación sobre el operador (o su corres-

pondiente zona sobre el mRNA) puede efectuarse de diversas maneras, bien por medio de una proteína alostérica, bien por medio de un tRNA o un análogo de éste. Y, por otra parte, la heterogeneidad de los tRNAs puede jugar un papel en la regulación de la traducción por causas distintas al bloqueo del operador o del polisoma.

1.4.11.3. Regulación de la biosíntesis de proteínas en mamíferos.

Como se ha visto en los apartados precedentes, los estudios de regulación se han realizado preferentemente en microorganismos. Estos, por su corto periodo de generación, permiten un detallado análisis genético, al que tanto debe el establecimiento de las hipótesis sobre mecanismos reguladores y, por otra parte, la relación entre el estado metabólico de un microorganismo y el medio es inmediata. Ninguna de estas dos facilidades se presentan en los organismos superiores, en los que la actividad biosintética de un tejido depende no sólo de las condiciones externas al organismo, sino también de las interrelaciones fisiológicas con otros tejidos.

A pesar de estas dificultades, los datos de que se dispone hasta la fecha parecen indicar la validez de un esquema semejante al de microorganismos. Knox pudo demostrar en 1951 que la enzima triptófano pirrolasa es inducible por el triptófano y por la cortisona (419). Los efectos de la hormona y del aminoácido son aditivos después de la extirpación de las cápsulas suprarrenales, lo que prueba que la inducción obedece a distintas causas en cada caso. Greengard y col. (420) utilizando un inhibidor de la transcripción -la actinomicina D- comprobaron que la inducción causada por la hormona tiene lugar a nivel de la transcripción, mientras que la activación producida por el triptófano no desaparece en presencia del antibiótico.

Los trabajos de Schimke y col. (421) han permitido decidir -apoyándose en estudios cinéticos- que el aumento de actividad de la enzima provocado por la cortisona es una auténtica inducción (en el sentido utilizado hasta ahora) mientras que el provocado por el triptófano se debe más bien a una estabilización de la enzima.

A partir de estos presupuestos, Pitot ha realizado amplios estudios sobre la regulación de la biosíntesis de proteínas en mamíferos, sobre todo en el caso de alteraciones neoplásicas (422-424). Con todo ello ha propuesto para tal regulación un esquema semejante al de la figura 4. (425). Los rasgos fundamentales de este esquema son los siguientes:

- 1°. Existe una regulación de la transcripción controlada por sustratos o productos, análoga a la que puede darse en microorganismos, en

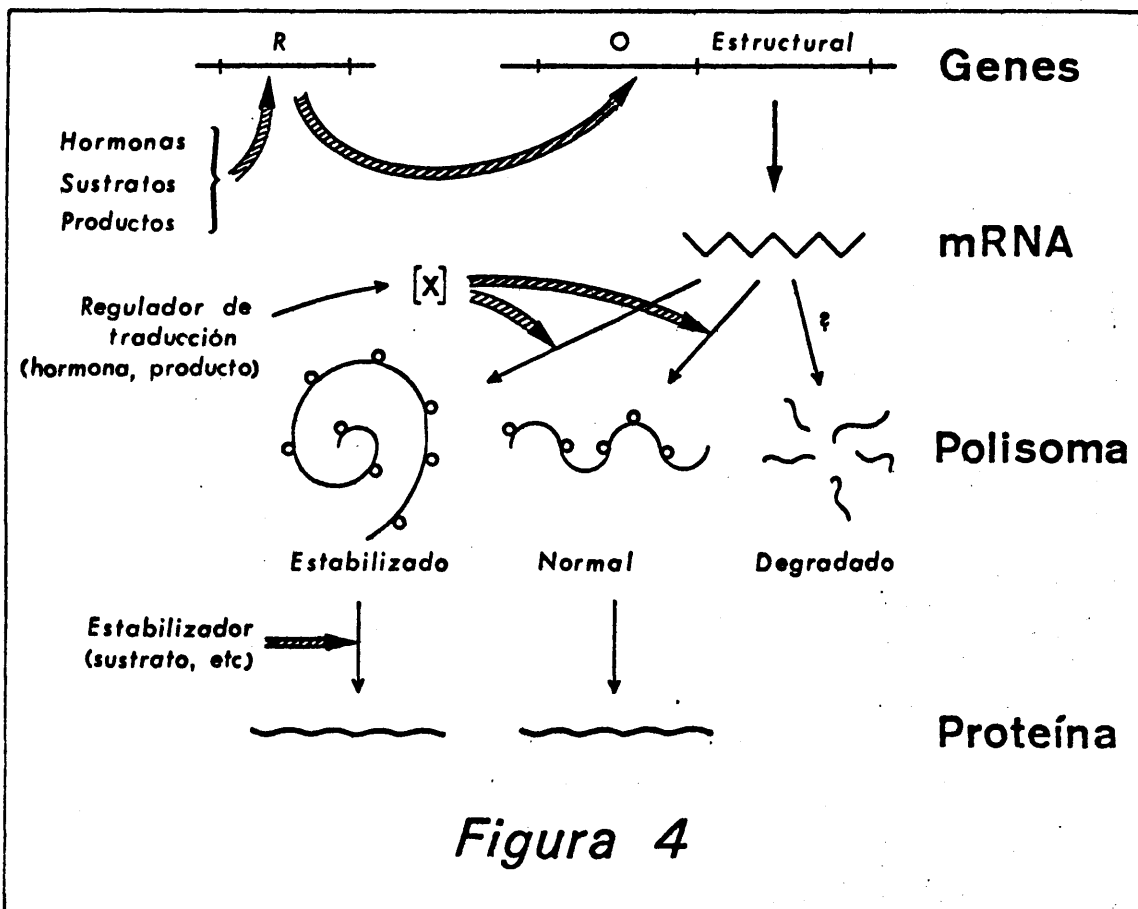
la que pueden intervenir además las hormonas.

2°. Pueden actuar además reguladores de traducción que conduzcan a un polisoma estabilizado (que no se degrada sino después de muchas lecturas del mRNA) o a un polisoma normal. Hay además agentes capaces de degradar instantáneamente el mRNA, impidiendo así la traducción.

3°. Además, algunos sustratos pueden modificar la vida media de las proteínas.

Para la investigación objeto de la presente memoria reviste un especial interés la actuación de las hormonas del tiroides sobre la biosíntesis de proteínas, ya que, como se ha visto en el apartado 1.3.1. el amitrol es un agente antitiroideo.

Aunque sea difícil situarlos de un modo definido en el esquema de la figura 4, se sabe que los efectos de la tiroidectomía son un aumento de la vida media de las proteínas hepáticas y una disminución de la velocidad de su biosíntesis. Predomina este último efecto sobre el primero, por lo que el hígado de las ratas tiroidectomizadas es menor que el normal (426).



1.4.12. Inhibición de la biosíntesis de proteínas.

Para completar la presente introducción teórica falta revisar, aunque sea someramente, los diversos factores externos que pueden alterar o detener el mecanismo normal de la biosíntesis de proteínas.

La posibilidad -varias veces apuntada en páginas precedentes- de utilizar sistemas acelulares para el estudio por separado de las diversas fases de la biosíntesis de proteínas ha permitido la localización más o menos exacta de la acción de los diversos inhibidores. El modo de acción de alguno de ellos es tan evidente después de conocido el mecanismo de la biosíntesis de proteínas que su actuación no requiere ninguna explicación. Tal es, por ejemplo, el caso de la ribonucleasa.

Otros inhibidores actúan exclusivamente a nivel de transcripción. La actinomicina D, conocido inhibidor de la biosíntesis de RNA, no afecta a la de proteínas en sistemas acelulares (318), es decir, no actúa en absoluto en la fase de traducción. Ni este antibiótico ni los de acción semejante se consideran en este apartado, reservado exclusivamente a los inhibidores de la biosíntesis de proteínas propiamente considerada.

1.4.12.1. Inhibidores que afectan el crecimiento de la cadena polipeptídica.

El mejor conocido de todos ellos es la puromicina. Su acción inhibidora de la síntesis de proteínas fue apuntada ya en 1955 por Creaser (429) y en 1959 Yarmolinsky y de la Haba (430) describieron la inhibición provocada en un sistema acelular a base de microsomas de hígado. En años posteriores se pudo comprobar que su acción inhibidora se extiende prácticamente a todos los organismos: bacterias (431), levaduras (432), algas (433), vegetales superiores (434) y mamíferos (435, 436).

La puromicina no afecta a la activación de aminoácidos, pero sí a su transferencia desde el tRNA a la cadena polipeptídica (430). En su presencia, los polipéptidos ya sintetizados dejan de crecer y se separan del ribosoma (435). Yarmolinsky y de la Haba fueron los primeros en llamar la atención sobre la semejanza estructural de la puromicina y el extremo 5' terminal de un aminoacil-tRNA, por lo que aquella puede ocupar competitivamente la zona del ribosoma destinada a fijar el aminoacil-tRNA. Llega incluso a formarse un enlace entre el péptido y el NH₂ de la puromicina. Por este motivo al incubar un sistema acelular con puromicina marcada isotópicamente con ³H o ¹⁴C aparece radiactividad en el material insoluble en ácido tricloroacético (437, 438) y el grupo amino del resto p-metoxifenilalanilo de la puromicina no reacciona ya con fluorodinitrobenceno (439).

La puromicina provoca además la degradación de los polisomas (436), pero no está del todo claro si este efecto es o no consecuencia del primero.

1.4.12.2. Antibióticos que inhiben la función del ribosoma.

Son muchos los antibióticos que inhiben la biosíntesis de proteínas en organismos procarióticos a nivel del ribosoma. El conocimiento cada vez más profundo de la organización y función de esta partícula subcelular ha permitido en muchos casos localizar la subunidad ribosomal sobre la que tales inhibidores actúan.

a) Inhibidores de la subunidad 30 S.

El más importante de todos es la estreptomicina, de la que se ha mencionado alguna función en el apartado 1.4.7.4. La estreptomicina inhibe la incorporación de aminoácidos en sistemas acelulares, tanto dirigida por mensajeros naturales (440) como por polinucleótidos sintéticos (441) pero además puede conducir a una lectura anormal del mensaje genético. Puede, por ejemplo, estimular la incorporación de isoleucina (codones AUU, AUC y AUA) en presencia de poliU, mientras que inhibe la síntesis del producto normal, polifenilalanina (442, 443). También, en presencia de estreptomicina pueden actuar como "template" polímeros que habitualmente no lo son, como el rRNA, tRNA o DNA desnaturalizado (444, 445). Estos efectos están relacionados con la composición del medio y son singularmente sensibles a la concentración de Mg^{2+} e incluso de tRNA (446). Quizá guarde relación con ello el hecho de que al emplear sistemas muy purificados la estreptomicina no produce errores de traducción (447).

Recientemente Sherman y Simpson (354) han demostrado que la estreptomicina induce alteraciones conformacionales en el ribosoma, como ya se ha expuesto. Pero a pesar de este importante hallazgo sigue sin conocerse exactamente el proceso molecular por el que este antibiótico ejerce su acción. Con los datos actuales no es posible discernir si la inhibición de biosíntesis y los errores de traducción obedecen a una causa común (la alteración conformacional) o son independientes.

Los antibióticos de los grupos de la neomicina y kanamicina afectan también la biosíntesis de proteínas a nivel de la subunidad ribosomal 30 S con un espectro de acción -inhibición y alteración de la traducción- semejantes a la estreptomicina (445).

Las tetraciclinas son también potentes inhibidores de la biosíntesis de proteínas cuya acción se ha situado a nivel de la subunidad 30S. Una concentración de 10 $\mu g/ml$ es suficiente para inhibir en un 80-90% la síntesis de

polifenilalanina dirigida por poliU pero no inhibe la unión del polinucleótido a los ribosomas (448). La acción principal de las tetraciclinas parece centrarse en la inhibición de la unión del aminoacil-tRNA a la zona A de la subunidad 30 S (338, 449).

b) Inhibidores de la subunidad 50 S.

El cloramfenicol es, junto con la puromicina, el inhibidor de la síntesis de proteínas conocido desde hace más tiempo, ya que fue descrito por primera vez por Gale y Folkes en 1953 (450). Es capaz de inhibir la biosíntesis de proteínas en bacterias, tanto gram-positivas como gram-negativas (445), protozoos (451) y vegetales superiores (434, 452, 453). Los sistemas acelulares de mamíferos son, sin embargo más resistentes al cloramfenicol, excepción hecha de los derivados de reticulocitos (454, 455).

El cloramfenicol inhibe la síntesis de polilisina y poliprolina, dirigidas respectivamente por poliA y poliC. Una concentración del antibiótico de 400 µg/ml detiene casi totalmente la síntesis de polilisina y, en su presencia, sólo se pueden llegar a formar di- o tripéptidos (456), pero sin embargo la síntesis de polifenilalanina en presencia de poliU es mucho más resistente (457).

Los primeros trabajos realizados para localizar su acción indicaron que el cloramfenicol inhibía la polimerización de aminoácidos sobre el ribosoma a partir del aminoacil-tRNA (458). Las experiencias de Weisberger y col. (454, 459) parecían indicar que la inhibición se producía al impedir la unión del mRNA al ribosoma, pero los trabajos de Vázquez demostraron que el cloramfenicol interaccionaba exclusivamente con la subunidad 50 S (460, 461). En 1967 Monro y Marcker utilizaron un sistema simplificado para estudiar la formación del enlace peptídico compuesto por fmet-ACCAAC (obtenido por hidrólisis del fmet-tRNA por ribonucleasa T₁), puromicina y subunidades 50 S. Normalmente la reacción da origen a formilmethionil-puromicina (462), pero el cloramfenicol la inhibe (463). Con estos datos se admite generalmente que el antibiótico inhibe la peptidilsintetasa, localizada específicamente en la subunidad 50 S.

Recientemente, sin embargo, Pestka ha encontrado evidencias a favor de otro modo de acción del cloramfenicol: la inhibición de la unión del extremo aminoaciladenililo del aminoacil-tRNA al ribosoma (464). Es posible que ambos efectos cooperen a la acción inhibidora de este antibiótico.

1.4.12.3. *Inhibidores de acción no localizada.*

Los inhibidores estudiados en los apartados precedentes son los mejor caracterizados, pero son muy numerosas las sustancias cuya acción sobre la biosíntesis de proteínas es manifiesta, aunque no se haya localizado exactamente el mecanismo de su inhibición.

Entre estas últimas merece citarse la esparsomicina, que inhibe la biosíntesis de proteínas en microorganismos y reticulocitos (465). Este antibiótico bloquea la formación del enlace peptídico probablemente por impedir la asociación del aminoacil-tRNA a la zona A del ribosoma (464).

La blasticidina S produce una inhibición del 50% en la síntesis de polifenilalanina a concentraciones del orden de 10^{-8} M (466) y su acción quizá se localice en la subunidad ribosomal 50 S.

La cicloheximida es también un inhibidor potente de la biosíntesis de proteínas en levaduras (467) y mamíferos (468, 469). Una concentración de 50 µg/ml reduce en un 55-65% la incorporación de aminoácidos en un sistema acelular obtenido a partir de células de adenocarcinoma 755 y casi en el 100% la síntesis de polifenilalanina en presencia de poliU (469), pero no está clara la localización de su acción. No altera la formación de aminoacil-tRNA (449) y se ha sugerido que actúa por rotura de polisomas (470).

1.4.12.4. *Inhibición de la biosíntesis de proteínas por sustancias con actividad fitotóxica.*

Son escasos los estudios sistemáticos realizados acerca de la actividad de los inhibidores del crecimiento vegetal sobre la biosíntesis de proteínas. Además de los datos ya comentados al estudiar el modo de acción del amitrol, cabe resaltar el trabajo realizado por Mann y col. (94) que investigaron el efecto de 23 sustancias con actividad fitotóxica sobre la incorporación de leucina- ^{14}C por cortes de semillas de dos especies vegetales. El método seguido en su trabajo es, sin embargo, demasiado simple para decidir de modo inequívoco si existe una alteración de la biosíntesis de proteínas. En esencia consiste en determinar la incorporación de leucina- ^{14}C , después de incubar el corte de tejido con el aminoácido, mediante conteo por centelleo líquido del propio corte de tejido lavado (471). Para tener en cuenta la posible influencia del herbicida sobre la permeabilidad del tejido con respecto a los aminoácidos, estudian su efecto frente a la incorporación de un aminoácido no proteico: el ácido α -aminobutírico.

De tal manera han podido constatar que, de los 23 fitotóxicos ensayados, solamente el CDAA (2-cloro-N, N-dialilacetamida), CIPC (isopropil-N-

(3-clorofenil)carbamato) y el ioxinil (o,o'-diiodo-p-cianofenol) inhiben notablemente la incorporación de leucina. De ellos el ioxinil es el más activo, ya que la inhibición es del 82% con una concentración de 2 ppm y del 88% a 4 ppm en cortes de Sesbania exaltata.

De todas formas, las limitaciones de la técnica no permiten dilucidar si tal efecto corresponde realmente a una inhibición de la biosíntesis de proteínas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. BIOSINTESIS IN VITRO DE PROTEINAS

2.1.1. Valoración de proteínas solubles.

Para valoraciones rápidas de proteínas solubles se ha utilizado la fórmula de Kalckar (472):

$$P = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260}$$

en la que P representa la concentración de proteínas en mg/ml en una disolución en función de sus absorbancias a 280 y 260 nm. (A_{280} y A_{260} respectivamente) medidas en cubetas de 1 cm de espesor.

Con el mismo fin, se ha utilizado alternativamente la ecuación de Layne (473):

$$P = F \frac{1}{d} A_{280}$$

donde P y A_{280} tienen el significado anteriormente dicho, d es la anchura de la cubeta en cm y F un factor que se encuentra tabulado frente al cociente A_{280}/A_{260} (Tabla VIII). Esta tabla permite también la apreciación rápida aproximada de la relación de concentraciones entre ácidos nucleicos y proteínas. Los valores que resultan para concentración de proteínas son tanto más exactos cuanto más baja sea la proporción de ácidos nucleicos.

Ninguno de los dos métodos indicados proporciona una exactitud conveniente, por lo que su uso se limita en la presente investigación a valoraciones previas.

Para obtener una mayor precisión, aún en presencia de ácidos nucleicos, se sigue el método de Lowry y col. (474) que se describe a continuación. A 5 ml de una mezcla recientemente preparada de 50 partes de reactivo A (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N) y una de B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%) se añade 1 ml de la disolución problema y se agita fuertemente. La mezcla se deja estar 30 min a temperatura ambiente con agitación ocasional y a continuación se añaden 0,5 ml de reactivo Folin-Ciocalten

TABLA VIII

PORCENTAJE DE ACIDOS NUCLEICOS Y FACTOR F DE LAYNE EN FUNCION
DE LA RELACION DE ABSORBANCIAS A 280 Y 260 nm.

<u>A_{280}/A_{260}</u>	Porcentaje de <u>ác. nucleicos</u>	<u>F</u>
1.75	0.00	1.116
1.63	0.25	1.081
1.52	0.50	1.054
1.40	0.75	1.023
1.36	1.00	0.994
1.30	1.25	0.970
1.25	1.50	0.944
1.16	2.00	0.899
1.09	2.50	0.852
1.03	3.00	0.814
0.979	3.50	0.776
0.939	4.00	0.743
0.874	5.00	0.682
0.846	5.50	0.656
0.822	6.00	0.632
0.804	6.50	0.607
0.784	7.00	0.585
0.767	7.50	0.565
0.753	8.00	0.545
0.730	9.00	0.508
0.705	10.00	0.478
0.671	12.00	0.422
0.644	14.00	0.377
0.615	17.00	0.322
0.595	20.00	0.278

(475). Se agita hasta conseguir una mezcla perfecta y se deja otros 40 min en las mismas condiciones. Al cabo de este tiempo, se determina la absorbancia de la disolución a 500 nm frente a un blanco en el que la disolución de proteínas se sustituye por agua destilada. Ordinariamente se construye la curva patrón con seroalbúmina de buey (Sigma Chem. Co.), con la que se cumple la Ley de Lambert-Beer para concentraciones comprendidas entre 150 y 900 $\mu\text{g/ml}$. Para ajustar la concentración del problema a este intervalo se ha hecho uso de cualquiera de las valoraciones espectrofotométricas indicadas anteriormente.

2.1.2. Preparación de un sistema acelular de hígado de cobaya.

2.1.2.1. *Obtención de ribosomas. (476)*

Se utilizan **cobayas** de 250-400 g de peso que se sacrifican por decapitación. El hígado se extrae rápidamente y, una vez extirpada la vesícula biliar se lava en un medio A, enfriado en baño de hielo, que contiene: sacarasa 0,35 M; MgCl_2 0,004 M; KCl 0,025 M y tampón de tris (hidroximetil) aminometano (tris) 0,05 M, pH 7,6. A partir de este momento todas las operaciones se desarrollan a temperatura inferior a 4°. El hígado lavado se trocea con tijeras y se homogeneiza en fracciones de 8 g en un homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, durante 20 seg con 19 ml de medio A. El homogeneizado se centrifuga a 15.000 g durante 10 min con el fin de eliminar las partículas pesadas (núcleos, mitocondrias y células intactas principalmente). El sobrenadante se centrifuga entonces a 105.000 durante una hora. La fracción soluble se guarda para preparar las enzimas "pH 5" como se describe más adelante y los sedimentos (fracción "microsomal") se reúnen en medio A (1 ml por g de hígado homogeneizado). La suspensión se diluye a 5 volúmenes con un medio B que contiene sacarosa 0,90 M; MgCl_2 0,004 M y KCl 0,025 M. A continuación se añade MgCl_2 0,1 M (0,33 ml/g de hígado) para evitar la disociación de los ribosomas en subunidades de 40 y 60 S y para precipitar la ferritina (477), ya que, de no hacerlo, contaminaría la fracción ribosomal al tener un coeficiente de sedimentación de 63 S (478).

Posteriormente se adiciona desoxicolato sódico al 3% en fracciones de 5 ml con agitación continua hasta llegar a una concentración final del 0,27%. Este detergente destruye gran parte de las membranas del retículo endoplásmico y libera la totalidad de los ribosomas. La suspensión resultante

se centrifuga a 105.000 g durante 10 min y el sedimento (ferritina precipitada y algo de desoxicolato magnésico) se desecha. El sobrenadante se somete a una nueva centrifugación a 105.000 g, esta vez durante una hora, el sedimento de ribosomas así obtenido se lava superficialmente con medio A, con objeto de eliminar el exceso de desoxicolato y se suspende en el mismo medio (0,046 ml/g de hígado). El preparado de ribosomas es estable a -15° por lo menos 15 días.

En algunas experiencias, con el fin de inactivar la ribonucleasa, se ha seguido la modificación propuesta por Murthy y Rappoport (479) que consiste en añadir al medio de homogeneización bentonita activada hasta una concentración final del 2%.

Al objeto de eliminar al máximo la presencia de desoxicolato en la fracción ribosomal -que se traduce en una disminución en la actividad para incorporar aminoácidos- se ha sustituido en algunos casos el lavado superficial del sedimento de ribosomas por una resuspensión en medio A seguida de una nueva centrifugación a 105.000 g durante una hora. Es menester realizar la resuspensión de ribosomas con el máximo cuidado posible para no dañar la estructura polisómica. En la presente investigación se ha efectuado siempre mediante un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, de 9 mm de diámetro, con émbolo de teflón accionado a mano.

En todos los casos, la determinación de la concentración de ribosomas en el preparado final se realiza valorando las proteínas ribosomales por el método de Lowry y col. (474). Asimismo se ha obtenido siempre un espectro ultravioleta del preparado en un espectrofotómetro Beckman modelo DB-G.

2.1.2.2. Fracción enzimática "pH 5" (480).

El sobrenadante de la primera centrifugación a 105.000 g se diluye con medio B (1:3, vol/vol) y, a partir de este momento, se trabaja a 0°. Se ajusta inmediatamente el pH a 5,15-5,20 por adición de suficiente ácido acético 1 N con agitación. El precipitado se recoge por centrifugación y se lava una vez por resuspensión en medio B y nueva centrifugación. El residuo se disuelve entonces en un medio C que contiene: sacarosa 0,35 M; KHCO_3 0,035 M; MgCl_2 0,004 M y KCl 0,025 M, en cantidad adecuada para dar una disolución en la que la concentración de proteínas sea de 8 a 12 mg/ml. Este valor se ajusta por valoración espectrofotométrica como se ha descrito anteriormente (472, 473) y la concentración final exacta se determina por el método colorimétrico de Lowry y col. (474).

- 71 -

En algunas experiencias se ha utilizado tampón tris 0,1 M, pH 7,5, en vez de medio C, para preparar la disolución enzimática (481). La actividad de la fracción enzimática "pH 5" se conserva durante varias semanas si se guarda a -10° y resulta aún más estable en presencia de glutatión (forma reducida) 0,05 M y ácido etilendiaminotetraacético 0,005 M. El preparado enzimático así obtenido contiene el RNA soluble además de las enzimas necesarias para el proceso de biosíntesis de proteínas in vitro.

2.1.2.3. Incubación y medida de la radiactividad.

La mezcla de incubación se ha preparado por el método de Kirsch y col. (476). En tubos de vidrio "Pyrex" de paredes gruesas se mezclan: pirúvico quinasa: 0,14 mg; ATP (sal trisódica): 1,0 μ mol; ácido fosfoenolpirúvico (sal trisódica): 10 μ moles; GTP (sal trisódica): 0,25 μ moles; $MgCl_2$ 5,0 μ moles; fracción enzimática "pH 5": 0,1 ml (equivalente a 0,8-1,2 mg de proteína); ribosomas : 3-4 mg; aminoácidos- ^{14}C (7 mCi/mmol): 0,1 μ mol. El volumen se completa a 2 ml con tampón tris 0,05 M pH 7,5 y, en su caso, se añade el amitrol disuelto en este tampón manteniendo el mismo volumen final, después de lo cual la mezcla se incuba a 37° . La incubación se ha realizado indistintamente en baño de agua termostatzado o en una incubadora New Brunswick, modelo R-26 con agitación continua.

Después de este tiempo se precipitan las proteínas por adición de 2 ml de ácido tricloroacético al 10% frío. El precipitado se recoge por centrifugación y las proteínas se aíslan por el método de Siekevitz (482). Para ello, el precipitado se lava tres veces con ácido tricloroacético al 5% en frío y, posteriormente, se hidrolizan los ácidos nucleicos por tratamiento con la misma disolución ácida a 90° durante 20 minutos. El precipitado resultante, que sólo contiene proteínas y posibles lípidos, se lava dos veces con etanol del 96% en caliente, otras dos con una mezcla de etanol-éter etílico-cloroformo (2:2:1) en caliente y, finalmente, una vez con éter anhidro también en caliente. Después de esta serie de lavados, realizados todos en una centrífuga Martin Christ "Piccolo", el residuo se deja secar al aire a temperatura ambiente. Las muestras de proteínas pulverizadas se pasan a planchetas de poli-(metacrilato de metilo) de 0.33 cm^2 de superficie previamente taradas. Las planchetas se pesan y se mide la radiactividad mediante un tubo Geiger acoplado a un amplificador y escala Ecko N683A. El espesor infinito se alcanza en el conteaje de proteínas- ^{14}C a los 16 mg/cm²

(483) por lo que se aplica corrección de autoabsorción para las muestras cuyo peso sea inferior a 5.5. mg. La corrección se aplica en la forma descrita por Aronoff (484) después de calcular el coeficiente de absorción, K , a partir de los datos de Campbell y Sargent (483). El detalle de la aplicación de tal corrección se describe en la parte tercera de esta memoria.

En todos los casos se han contado las muestras durante tiempo suficiente para que el error estadístico sea menor del 5%, operando con un intervalo de seguridad del 90%.

2.1.3. Preparación de un sistema acelular de corteza de cerebro de conejo.

2.1.3.1. Fracción "microsomal" (485).

Se han utilizado conejos machos de 2-3 kg de peso. Una vez sacrificados por decapitación se extrae rápidamente el cerebro y se enfría en sacarosa isotónica (9.25%). Se separa la corteza de la materia blanca, se trocea y se tritura en frío con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio usando un volumen igual de medio A (sacarosa 0,25 M; KCl 0,025 M; $MgCl_2$ 0,005 M; tris 0,05M, pH 7,6). El homogeneizado se centrifuga a 8.000 g durante 10 min, se desecha el residuo y el sobrenadante se somete a una nueva centrifugación, esta vez a 105.000 g durante una hora. El sobrenadante de esta última centrifugación ($S_{105.000}$) se guarda para proceder al aislamiento de enzimas, como se detalla más adelante. El residuo, fracción "microsomal", se lava con medio A y se resuspende en el mismo medio hasta conseguir una concentración aproximada de partículas de 15 mg/ml. La determinación de las proteínas microsomales se realiza en la forma descrita.

2.1.3.2. Fracción enzimática "pH 5". (485).

El sobrenadante $S_{105.000}$ se lleva a pH 5,0 mediante la adición de ácido acético 1N con agitación, después de lo cual se deja estar a 0° durante 5 min y se centrifuga. El precipitado, compuesto al igual que en hígado por enzimas y sRNA, se lava superficialmente con agua y se disuelve inmediatamente en medio A. A esta disolución se añade suficiente KOH 0,1 N para ajustar el pH a 7,6 (medido a 0°). La fracción enzimática "pH 5" de cerebro -al igual que la de hígado- es estable varias semanas si se conserva a -10°.

2.1.3.3. Incubación y medida de la radiactividad (485).

La mezcla de incubación se prepara mezclando en tubos de vidrio "Pyrex" los siguientes componentes: pirúvico quinasa: 0,14 mg; ácido fosfoenolpirúvico (sal trisódica): 10 μ moles; ATP (sal trisódica): 1,0 μ mol; GTP

(sal trisódica): 0,25 μ moles; sacarosa: 250 μ moles; KCl: 25 μ moles; $MgCl_2$: 5 μ moles; tampón tris, pH 7,8: 50 μ moles; fracción enzimática "pH 5" o sobrenadante $S_{105.000}$: 1 mg de proteína; fracción microsomal: 3 mg; aminoácidos marcados (7 mCi/mmol): 0,1 μ mol. El volumen se completa con agua hasta 2 ml y el amitrol se añade, en su caso, en el mismo disolvente. La incubación, aislamiento y conteo de proteínas se efectúa por el procedimiento descrito en la sección 2.1.2.3.

2.1.4. Preparación de un sistema acelular de reticulocitos de conejo.

2.1.4.1. *Tratamiento previo de los animales.*

Se utilizan conejos machos de 2-3 kg de peso en los que se provoca la reticulocitosis por inyección subcutánea diaria de 1,0 ml de fenilhidrazina al 2,5% durante cinco días (486). La disolución de fenilhidrazina, ajustada a pH 7,0 con NaOH y filtrada se conserva a -15° en presencia de glutatión (reducido) 0,001 M, guardando en envase distinto la dosis de cada día. El sexto no se inyecta a los animales y el séptimo día se les sangra por punción cardíaca después de recibir una inyección intravenosa de heparina con el fin de evitar la coagulación de la sangre.

2.1.4.2. *Obtención de ribosomas (487).*

La sangre heparinizada se recoge a 4° y se centrifuga a 2.500 g durante 15 min. El plasma se desecha y las células se lavan por resuspensión en un volumen igual al del plasma de medio A que contiene: NaCl 0,13 M; KCl 0,005 M; $MgCl_2$ 0,0075 M. La suspensión se filtra a través de una gasa y se centrifuga como antes. Se recogen las células lavadas y se provoca su lisis por agitación suave durante 10 min en cuatro volúmenes de $MgCl_2$ 0,002 M. Se añade a continuación un volumen de medio C (sacarosa 1,5 M; KCl 0,15 M), se agita suavemente y se centrifuga a 15.000 g durante 10 min. El residuo, compuesto por el estroma y algunas células intactas, se desecha y la parte superior clara del sobrenadante se recoge por succión y se centrifuga a 105.000 g durante una hora. El sobrenadante de esta última centrifugación se guarda para aislar el tRNA y la fracción enzimática AS_{70} como se describe más tarde. El residuo, formado por ribosomas, se lava con un medio B (sacarosa 0,25 M; $KHCO_3$ 0,0175 M; $MgCl_2$ 0,002 M) y se resuspende en el mismo medio con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón operado a mano. Se centrifuga nuevamente a 105.000 g durante una hora y el sedimento se homogeneiza suavemente en sacarosa 0,25 M. La suspen-

si3n de ribosomas se centrifuga a 15.000 g durante 15 min y el sobrenadante se guarda congelado, despu3s de valorar las prote3nas ribosomales en la forma acostumbrada.

2.1.4.3. Obtenci3n de enzimas AS₇₀ (487)

Al sobrenadante de la primera centrifugaci3n a 105.000 g se a3ade suficiente tamp3n de tris 2,0 M, pH 7,5 para que la concentraci3n final resulte de 0,1 M. Se adiciona a continuaci3n, con agitaci3n constante, una disoluci3n neutralizada de sulfato de protamina (10 mg/ml) hasta alcanzar una concentraci3n final de 0,17 mg/ml, despu3s de lo cual se deja estar la mezcla 30 min en fr3o. Al cabo de este tiempo se recoge por centrifugaci3n el precipitado de protamina RNA formado y se guarda en fr3o hasta su utilizaci3n en la preparaci3n del tRNA. El sobrenadante se lleva a una saturaci3n del 40% en (NH₄)₂SO₄ por adici3n del reactivo pulverizado. La suspensi3n se deja estar una hora en fr3o para completar la precipitaci3n, se centrifuga y el residuo se desecha. El sobrenadante se lleva ahora a una saturaci3n del 70% en (NH₄)₂SO₄ en la misma forma que antes y, despu3s de esperar una hora se centrifuga a 15.000 g durante 10 min. El precipitado de prote3nas se lava por suspensi3n en un tamp3n de tris 0,1 M, pH 7,5 que contiene (NH₄)₂SO₄ (70% sat.) y se centrifuga de igual modo. El residuo lavado se disuelve en un tamp3n de tris 0,1 M pH 7,5 (se debe utilizar un volumen de tamp3n por cada cinco vol3menes de sobrenadante de partida) y se dializa durante 18 horas frente a un medio compuesto de tris 0,02 M, glutathion (reducido) 0,001 M y 3cido etilendiaminotetraac3tico 0,0001 M (pH=7,5) que se cambia dos veces. La disoluci3n resultante -fracci3n enzim3tica AS₇₀- se conserva a -20° en presencia de glutathion (reducido) 0,025 M y 3cido etilendiaminotetraac3tico 0,0025 M.

A diferencia de las fracciones "pH 5" de h3gado y cerebro, la fracci3n AS₇₀ contiene s3lo las enzimas necesarias para la bios3ntesis in vitro de prote3nas, ya que el RNA ha sido previamente eliminado por el tratamiento con protamina.

2.1.4.4. Obtenci3n de tRNA (488).

El precipitado de protamina- RNA se disuelve en un tamp3n de fosfato pot3sico 1M (pH = 6,5) utilizando un volumen igual a la d3cima parte del de las c3lulas de partida. Se a3ade un volumen igual de fenol al 90% y se agita fuertemente a temperatura ambiente durante una hora. La emulsi3n resultante se centrifuga a 10.000 g por espacio de 10 min. Se separa la capa acuosa (inferior) y la fen3lica se agita de la misma forma con un volumen

igual de agua. Después de una nueva centrifugación, la mezcla de capas acu^o sas se somete a diálisis frente a 200 volúmenes de tampón de tris 0,02 M pH 7,5 durante 3-4 horas, al cabo de las cuales se añade 0,1 volumen de una disolución de acetato potásico al 20%. Después de ajustar el pH a 5,5-6,0 se adicionan dos volúmenes de etanol frío y se guarda la mezcla durante 10-12 horas a 0°. El RNA precipitado se recoge por centrifugación a 10.000 g durante 10 min y se disuelve en una pequeña cantidad de agua. El exceso de acetato potásico se elimina mediante diálisis frente a un tampón de tris 0,02 M a pH 7,5, cambiado dos veces, durante 12 horas. La concentración de tRNA en la disolución resultante se determina mediante espectrofotometría ultravioleta a 260 nm.

2.1.4.5. *Incubación y medida de radiactividad.*

En la presente investigación se ha utilizado la mezcla de incubación propuesta por Allen y Schweet (487), pero el sistema regenerador de ATP es taba compuesto por pirúvico quinasa (0,14 mg) y ácido fosfoenolpirúvico (10 μ moles) en vez de creatinquinasa y fosfato de creatina. El medio contiene, además, en un volumen final de 2 ml: tRNA 50-100 μ g; ATP (sal trisódica): 1,0 μ mol; tampón de tris-HCl, pH 7,5: 50 μ moles; glutatión (forma reducida): 20 μ moles; KCl: 50 μ moles; GTP (sal trisódica): 0,25 μ moles; $MgCl_2$: 5 μ moles; fracción enzimática AS₇₀: 1-2 mg; ribosomas: 4-8 mg; aminoácidos-¹⁴C: (7mCi/mmol): 0,1 μ mol; aminoácidos-¹²C: 0,1 μ mol de cada uno.

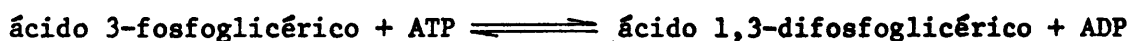
La incubación se desarrolla en la forma indicada anteriormente, y la reacción se detiene por adición de 2 ml de ácido tricloroacético al 10% frío. Las proteínas se aíslan por una modificación del método de Siekevitz (482) que consiste en redissolver el precipitado en NaOH 1 N (0.5-1.0 ml) después del segundo lavado con ácido tricloroacético, para volver a precipitar, al cabo de dos minutos exactos, con el mismo reactivo (487). La ra diactividad incorporada en las proteínas se determina en la forma descrita.

2.1.5. Ensayo de actividad de las aminoácido-tRNA ligasas.

La determinación de la actividad de aminoácido-tRNA (AMP) ligasas (EC 6.1.1.-) se ha realizado por un método original, midiendo la desaparición de actividad de ATP- γ -³²P en presencia de pirofosfato normal.

2.1.5.1. *Preparación de ATP- γ -³²P.*

El ATP- γ -³²P se prepara por el método de Glynn y Chappell (489), que aprovecha la reacción de equilibrio:



El ácido 1,3-difosfoglicérico se prepara "in situ" por fosforilación enzimática del 3-fosfoglicérico.

Para ello se mezclan en un tubo de ensayo, en el orden indicado: 5 ml de tris 1.0 M, pH 8.0, que contiene MgCl_2 0.012 M; 1 ml de cisteína 0.02 M en NaOH 0.1 N; 1 ml de una disolución de ATP (sal disódica) 0.06 M; 1 ml de ácido 3-fosfoglicérico (sal tricitclohexilamónica) 0.01 M; 1 ml de $\text{Na}_3^{32}\text{PO}_4$ en NaCl 0.14 M a pH 7.0; 1 mg de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa suspendido en 100 μl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 M; 100 μg de fosfogliceroquinasa de levadura suspendida en 50 μl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.7 M que contiene $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.04 M a pH 7.0.

Después de efectuada la mezcla se añade agua hasta un volumen final de 10 ml y se incuba durante una hora en baño de agua a 26°. Al cabo de este tiempo, el contenido del tubo se vierte sobre 50 ml de etanol del 96% frío, se lava el tubo con 10 ml de etanol del 17% (vol/vol) y el lavado se añade a la mezcla anterior. Esta tiene en este momento aspecto opalescente y se aclara por adición de agua (aproximadamente 3 ml). De la disolución resultante (unos 73 ml) se toma una muestra de 0.5 ml para determinar la actividad y concentración del ATP y el resto se concentra a 40° bajo vacío hasta un volumen de 10 ml.

El concentrado se filtra por papel Whatman n° 1 y a continuación se pasa a una columna que contiene 1 g de Dowex 1, con una altura de lecho de 3.5 cm. El papel de filtro se lava con 10 ml de agua y este lavado se añade a la columna, que se lava a continuación con 40 ml de NH_4Cl 0.020 M en HCl 0.020 N que elimina el ADP, fosfato inorgánico y las trazas de AMP que pudieran existir en la mezcla de reacción. Se pasan por la columna, inmediatamente después, 40 ml de agua para eliminar el NH_4^+ y, finalmente, el ATP se eluye con HCl 0.25 N.

El eluido se recoge en frío y a los primeros 14 ml se añade tris base 1 M en cantidad suficiente para llevar el pH a 7.4 (ordinariamente se necesitan 3.4 ml aproximadamente). La recuperación del ATP suele ser del 60%. Si se deseara mayor rendimiento sería necesario seguir eluyendo con HCl, a costa de diluir el ATP.

En el eluido la concentración de ATP suele ser de 2 $\mu\text{moles/ml}$. Con el fin de obtener disoluciones más concentradas y eliminar el tris (cuya concentración es aproximadamente 0.25 M), la mezcla se somete a cromatografía centrífuga (490) sobre Norit SX-1. El carbón activo (0.5 g) se lava pre-

viamente con 5 ml de agua y se añade después sobre la columna la disolución de ATP en tris. Se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos, con lo que todo el ATP se adsorbe, y después se lava tres veces con 5 ml de agua, centrifugando de igual forma. El tris y el posible fosfato inorgánico pasan con el agua de lavado y el ATP se eluye con etanol al 50% que contiene un 1% de NH_4OH . Se sigue pasando eluyente hasta que la absorbancia a 260 nm sea despreciable. Ordinariamente son necesarios 50 ml del medio de elución para recuperar un 80% del ATP adsorbido.

El eluido, finalmente, se filtra por membranas Millipore de 0.80 μm de diámetro de poro para eliminar el carbón activo y se lleva a sequedad por liofilización.

2.1.5.2. Intercambio ATP-PP.

Para determinar la actividad de ligasas haciendo uso de la reacción de intercambio ATP-PP se prepara una mezcla que contiene por cada ml: ATP- ^{32}P : 5 μmoles (aprox. 50.000 cpm); MgCl_2 : 10 μmoles ; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: 50 μmoles ; NaF : 50 μmoles ; tampón de tris, pH 7,8: 100 μmoles ; aminoácidos- ^{12}C : 3 μmoles de cada uno. La mezcla se equilibra a 37° en baño de agua y la reacción se comienza por adición de la fracción enzimática "pH 5" o, alternativamente, del sobrenadante de 105.000 g (fracción soluble) en tal cantidad que la concentración final de proteína en el medio de incubación sea de 1 mg/ml. Al mismo tiempo se desarrolla un blanco en el que la preparación enzimática se sustituye por agua destilada.

A intervalos de tiempo variables se toman alícuotas de la mezcla de incubación de 100 μl , que se pipetea, para detener la reacción, sobre el mismo volumen de ácido tricloroacético al 10% mantenido en baño de hielo. El precipitado de proteínas se elimina por centrifugación y se aplican 10 μl del sobrenadante sobre papel Whatman n° 1, lavado previamente con una disolución 0.1 M de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La separación del ATP se efectúa por cromatografía descendente a temperatura ambiente durante 18-20 horas en un sistema de disolventes, recientemente preparado por mezcla de 8 volúmenes de isopropanol y 10 de una disolución de ácido acético- NH_4OH 1 N- EDTA 0.1 M (51:50:1.5 en volumen).

Una vez desarrollado, el cromatograma se pone en contacto, en cámara oscura con papel fotográfico (Valca, para fotocopias) y se ilumina con luz ultravioleta durante 7 seg. El papel impresionado se revela y se fija (5 y

15 min respectivamente) utilizando productos comerciales convencionales, y, con su ayuda, se sitúan exactamente las manchas de ATP sobre el cromatograma. Se recortan éstas y la actividad se mide directamente sobre el papel. En las experiencias que se describen más adelante se ha utilizado un tubo Geiger acoplado a un amplificador y escala modelo JEN E 26. En algunas experiencias se ha realizado adicionalmente una autorradiografía del cromatograma al objeto de comprobar los resultados.

2.2. BIOSINTESIS IN VIVO DE PROTEINAS

2.2.1. Tratamiento previo de los animales.

Se han utilizado ratas albinas adultas, machos o hembras según las experiencias, pero siempre en lotes homogéneos en sexo y edad. Los animales sometidos a tratamiento se inyectan por vía intraperitoneal con amitrol disuelto en NaCl 0,9% en dosis variables que se indican en la descripción de cada experiencia. Los animales de control reciben, en los mismos días NaCl 0,9% por la misma vía. En el transcurso de algunas experiencias se ha recogido, para su posterior análisis, la orina de los animales.

2.2.2. Incorporación de aminoácidos-¹⁴C in vivo.

Los animales, mantenidos con una dieta patrón se tratan en la forma descrita durante periodos de tiempo variables. Al final del tratamiento se sustituye el alimento por una dieta preparada con caseína-NaHCO₃. Doce horas después se inyecta a todos los animales leucina-1-¹⁴C, disuelta en NaCl 0,9%, por vía intramuscular (20-100µCi/Kg de peso). Una hora después de esta inyección los animales, previamente anestesiados con éter, se sacrifican por punción cardiaca. Se extraen rápidamente el hígado y el bazo que se lavan con NaCl 0,9% frío, se secan con papel de filtro, se trocean y se congelan en aire líquido. Las muestras de tejidos se guardan a -20° hasta su utilización. La sangre, recogida en tubos de centrífuga, se deja coagular a 15° durante 1-2 horas. Al cabo de este tiempo, se separa el coágulo por centrifugación y el suero se conserva a 0-5°.

Los tejidos troceados y congelados se homogeneizan en 8-10 volúmenes de ácido tricloroacético al 10% frío (491). El precipitado se recoge por centrifugación y, a partir de él, se aislan las proteínas por el método de Siekevitz (482). La determinación de la radiactividad incorporada en las proteínas se realiza por contaje a espesor infinito en planchetas de poli (metacrilato de metilo) de 1 cm² en la forma descrita anteriormente. La ac

tividad de las proteínas de suero se determinan por la modificación del método de Mans y Novelli (492) propuesta por Bennet y col. (469). Se depositan 50 µl de suero en el centro de discos de papel Whatman 3 MM de 2,6 cm de diámetro que se sumergen en ácido tricloroacético al 5% frío durante 5 min. El precipitado de proteínas queda, de esta forma, ocluido entre las fibras del papel, por lo que se procede al lavado del mismo con la serie de disolventes descrita en la sección 2.1.2.3. Finalizado el último lavado con éter los discos se adhieren a planchetas de acero inoxidable de 1" de diámetro y se dejan secar al aire a temperatura ambiente. El conteo de las muestras así preparadas se efectúa en un contador Geiger sin necesidad de aplicar correcciones de autoabsorción ya que el espesor de la capa de proteínas es igual al del papel y, por tanto, puede considerarse constante.

2.2.3. Valoración simultánea de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos en hígado.

2.2.3.1. Separación selectiva.

El estudio de la influencia del amitrol sobre el contenido de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos en hígado de rata se ha llevado a cabo previa separación selectiva de estos componentes por el método de Shibko y col. (493).

Para ello, los animales se han dividido en dos grupos que han recibido, en la forma descrita, amitrol (1 g/Kg) y NaCl al 0,9%. Al final del tratamiento las ratas se sacrifican por decapitación, se extrae rápidamente el hígado, se trocea, se lava con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, se seca con papel de filtro y se pesa. Inmediatamente el hígado troceado se homogeneiza en el mismo tampón (1 ml/g de hígado) y se diluye con agua destilada hasta 16 volúmenes. Todas estas operaciones se realizan a temperatura de 0-4°.

A 10 ml del homogeneizado diluido se añade entonces 1 ml de HClO_4 al 70% frío y se deja estar la mezcla durante 15 min a 0°. Al cabo de este tiempo el precipitado se separa por centrifugación y se lava dos veces con 10 ml de HClO_4 al 5% frío. Los sobrenadantes de estos lavados, junto con el de la primera centrifugación (fracción ácido-soluble) se guardan a -20° hasta su posterior utilización para la valoración de aminoácidos libres.

El precipitado se resuspende en 18 ml de NaOH 0,3 N y se incuba a 37° durante una hora. Este tratamiento hidroliza parcialmente el RNA. La disolución resultante se enfría, se añaden 2 ml de HClO_4 al 70%, se deja duran

te 10 min a 0° y se centrifuga. El precipitado se lava posteriormente con 10 ml de HClO_4 al 5%. Los oligorribonucleotidos resultantes de la hidrólisis parcial del RNA no precipitan en estas condiciones, por lo que los sobrenadantes combinados (S-1) se guardan para su posterior análisis.

El precipitado se resuspende a continuación en 8 ml de HClO_4 al 1,5% y se calienta a 90° durante 20 min, con lo que el DNA se hidroliza parcialmente. La disolución se enfría, se añaden 0,5 ml de HClO_4 al 70% y se deja 10 min a 0°. El precipitado -proteínas y lípidos- se lava con 10 ml de HClO_4 al 1,5% para eliminar los oligodesoxirribonucleotidos y el sobrenadante de este lavado se reúne con el de la centrifugación anterior (S-2) y se guarda para la estimación posterior del DNA.

El precipitado se lava con 20 ml de HClO_4 al 0,35% en etanol, después con 10 ml de una mezcla de etanol-cloroformo (3:1) en frío, otros 10 ml de la misma mezcla a 37° a los que se añaden 5 ml de hexano y, finalmente, con 20 ml de éter. Los lípidos se extraen totalmente con esta serie de lavados, por lo que las disoluciones resultantes se reúnen (S-3) y se guardan para su valoración.

Las proteínas precipitadas se dejan al aire hasta la eliminación total del éter, después de lo cual se secan a 102° durante 20 min.

Todas las centrifugaciones mencionadas en este apartado se han realizado en una centrífuga Martin Christ Junior II a 6.000 rpm durante 20 min.

2.2.3.2. *Valoración de proteínas.*

La cantidad de proteínas presentes en el hígado es lo suficientemente alta para que la determinación de las presentes en el precipitado pueda realizarse por pesada (493). En efecto, el precipitado seco, una vez eliminada la fracción soluble (que contiene también el glucógeno), los ácidos nucleicos y los lípidos, está exclusivamente compuesto por proteínas y su cantidad permite una valoración gravimétrica con poco error. Se ha adoptado, pues, este método en vez de una valoración colorimétrica, que implicaría la solubilización del precipitado.

2.2.3.3. *Valoración del RNA.*

La fracción S-1 contiene - como acaba de indicarse - los oligorribonucleotidos procedentes de la hidrólisis parcial del RNA, pero pueden también estar presentes algunas proteínas que se hayan solubilizado por el tratamiento con NaOH en caliente. La relación proteínas/RNA en la fracción

ción S-1 se ha estimado a partir de los valores de la absorbancia de la disolución a 280 y 260 nm, medidas sobre el espectro de la misma, realizado en un espectrofotómetro Beckman DB-G.

Como se verá más adelante, la contaminación de proteínas en la fracción S-1 es pequeña, lo que permite la valoración directa de los polinucleotidos a partir de la absorbancia a 260 nm, utilizando un coeficiente de extinción de $35.9 \mu\text{moles}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ y suponiendo un peso molecular medio de 1303 para los fragmentos de hidrólisis (494).

2.2.3.4. *Valoración de DNA.*

Los productos de degradación del DNA presentes en la fracción S-2 se han determinado mediante valoración colorimétrica de los restos de desoxirribosa con difenilamina (495). El reactivo se prepara mezclando los siguientes compuestos: ácido acético glacial (Merck), 150 ml; difenilamina (Merck) 2,25 g; ácido sulfúrico ($d=1.84$), 2,25 ml; disolución acuosa de acetaldehído (16 mg/ml), 1.12 ml.

A 2 ml de la fracción S-2 se añaden 4 del reactivo de difenilamina recientemente preparado y se deja la mezcla en la oscuridad durante 16-30 horas. Al cabo de este tiempo se mide la absorbancia de la disolución frente a un blanco, desarrollado en idéntica forma, en el que la fracción S-2 se sustituye por HClO_4 al 3,3% con el fin de ajustar la acidez al mismo valor del problema. La curva patrón se construye simultáneamente con cantidades conocidas de desoxirribosa (Sigma Chem. Co.) comprendidas en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 0.4 μM .

El método descrito valora exclusivamente la desoxirribosa. Los resultados se expresan en mg de DNA, suponiendo igual la proporción de los cuatro desoxirribonucleotidos en las muestras analizadas.

2.2.3.5. *Valoración de lípidos totales.*

La fracción S-3 se agita con una mezcla de 50 ml de hexano y 100 ml de agua y se decanta la fase orgánica que contiene los lípidos. El disolvente se elimina sin llegar a sequedad por destilación a vacío. El residuo se pasa cuantitativamente a pesasubstancias tarado se elimina el resto del disolvente a vacío y se determinan gravimétricamente los lípidos.

2.2.4. Valoración de aminoácidos.

2.2.4.1. *Preparación de las muestras.*

Los aminoácidos libres se valoran a partir de la fracción soluble en ácido perclórico (véase 2.2.3.1). La disolución se lleva a pH 7 con KOH 5

N a 0° con ayuda de un pH-metro Beckman, modelo Expandomatic. El precipitado de KClO_4 se separa por filtración en frío y la disolución resultante se concentra a sequedad bajo vacío. Se añade al residuo tampón citrato 0,2 N, pH 2,2 (496) (*). (10 ml por gramo de hígado) y se centrifuga para separar el resto de KClO_4 que no se disuelve en este medio.

2.2.4.2. Valoración de aminoácidos totales.

Se ha utilizado el método colorimétrico de Moore y Stein (497). El reactivo se prepara disolviendo 4 g de ninhidrina y 0,6 de hidrindantina en 150 ml de metoxietanol exento de peróxidos, procurando que no se emulsione aire en el líquido. Se añaden 50 ml de tampón acético-acetato 4 N, pH 5.51 y la disolución se pasa inmediatamente a un frasco de vidrio topacio y se conserva bajo nitrógeno. El reactivo es estable una semana si se conserva en la oscuridad.

La hidrindantina se ha preparado por el procedimiento de Abderhalden (498). Se disuelven 4 g de ninhidrina en 50 ml de agua a 90° y se añade, con agitación, una disolución de ácido ascórbico puro en 20 ml de agua a 40°. La mezcla se deja estar 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se enfría durante una hora con agua corriente. Los cristales de hidrindantina se recogen por filtración, se lavan con agua y se secan sobre P_2O_5 en la oscuridad. El producto (3.70 g) se conserva a -20° al abrigo de la luz.

Para preparar el tampón se disuelven 272 g de acetato sódico cristalizado en 200 ml de agua caliente. Se deja enfriar se añaden 50 ml de ácido acético glacial y el volumen se completa con agua a 500 ml. La disolución se conserva en frío.

Para realizar la valoración se mezcla en un tubo de ensayo 1 ml de reactivo y 1 ml de la disolución problema (de 0,05 a 0,10 μmoles de aminoácidos). Se han tomado para la valoración 10 μl de la disolución problema y se ha completado a 1 ml con tampón citrato.

La mezcla se agita rápidamente, el tubo se tapa con algodón y se introduce en baño de agua hirviendo durante 15 minutos exactos. Al cabo de este

(*) Este tampón contiene por litro: 21.0 g de ácido cítrico cristalizado, 8.4 g de NaOH, 16 ml de HCl concentrado, 5 ml de tiodiglicol y 5 ml de una disolución de Brij-35 (éter laurílico del polietilenglicol) al 50% (p/v).

tiempo el medio de reacción se diluye con un volumen igual de etanol al 50%. El tubo se enfría en corriente de aire hasta 30°, se agita fuertemente para facilitar la oxidación de la hidrindantina en exceso y se lee la absorbancia a 570 nm frente a un blanco, desarrollado al mismo tiempo, en el que el problema se sustituye por 1 ml de tampón citrato 0,2 N, pH 2,2.

La curva patrón se obtiene con L-leucina pura (Sigma Chem.Co.) 0,05-0,10 mM, disuelta en el mismo tampón. Los resultados de la valoración se expresan como μ moles equivalentes a leucina.

2.2.5. Análisis de proteínas.

Se han obtenido proteínas de hígado y suero de animales normales y tratados con amitrol, bien por el método de Siekevitz (482), bien por el de Shibko y col. (493). En todos los casos, las proteínas secas se hidrolizan en tubo cerrado con 20 volúmenes (volumen/peso) de HCl azeótropo (aprox. 6 N) a 105° durante 18 horas. Al cabo de este tiempo el hidrolizado se lleva a sequedad en vacío sobre KOH, se añade agua destilada y se vuelve a repetir el proceso dos veces con el fin de eliminar todo el HCl. El residuo seco se disuelve en tampón citrato 0,2 N, pH 2,2 y se centrifuga para eliminar los residuos de humina. Parte del sobrenadante se diluye con el mismo tampón hasta alcanzar una concentración equivalente a 1.25 mg de proteína hidrolizada por ml.

En algunos casos se ha efectuado un análisis previo de los aminoácidos del hidrolizado sin diluir por cromatografía en capa fina de celulosa. Para preparar las placas de homogeneizan 8 g de celulosa MN 300 (Machery-Nagel) en 48 ml de agua y 2 de etanol durante dos periodos de 1 minuto. La papilla resultante es suficiente para cubrir 5 placas de 20 x 20 cm con un espesor de 250 μ m (499).

Las placas se desarrollan bidimensionalmente utilizando butanol-acetona-dietilamina-agua, 10:10:2:5 en la primera dirección e isopropanol-ácido fórmico (99%)-agua, 40:2:5, en la segunda (499).

Para una estimación cualitativa previa de los aminoácidos se emplea como revelador ninhidrina al 0,2% en etanol, y con el fin de detectar la posible presencia de amitrolilalanina en proteínas, el reactivo "H" de Racusen (7).

En este último caso las placas se pulverizan con NaNO_2 al 1% en acetona-agua 80% (en volumen) y a continuación con HCl concentrado al 20% en acetona (en volumen), recientemente preparado. Después de esperar 10 minutos,

las placas se pulverizan finalmente con una disolución de ácido 8-amino-1-naftol-3,6-disulfónico al 0,25% en acetona-agua 50%. El reactivo es específico de aminotriazoles, que dan inmediatamente coloración roja.

En el hidrolizado diluido se valoran cuantitativamente los aminoácidos mediante un analizador automático Beckman, modelo Unichrom. Para el análisis de los aminoácidos ácidos y neutros se depositan 0.25 ml del hidrolizado en una columna de 66 x 0.9 cm cargada hasta una altura de 56 cm con resina tipo AA-15 (Beckman), equilibrada con un tampón de citrato sódico 0.20 N pH 3.28. El tampón se prepara mezclando 392.2 g de citrato sódico $2H_2O$, 246.5 ml de HCl concentrado, 100 ml de tiodiglicol, 2 ml de ácido n-caprílico, 40 ml de una disolución al 50% de Brij-35 y agua destilada en cantidad suficiente para completar el volumen a 20 l.

La elución se comienza con este mismo tampón, cuyo flujo se mantiene a 68 ml/hora, hasta los 103 minutos de desarrollo, al cabo de los cuales el tampón se sustituye por otro, de pH 4.25, con el que se continúa eluyendo a la misma velocidad hasta completar el análisis. Este último tampón se prepara de la misma forma que el anterior, salvo que la cantidad de HCl concentrado es sólo de 167.5 ml. Durante todo el tiempo del análisis la columna se mantiene termostatzada a 55° y se mantiene el flujo del reactivo de ninhidrina a 34 ml/hora. Para la preparación de este reactivo se disuelven 40 g de ninhidrina y 0.8 de $SnCl_2$ en 1.5 l de metil celosolve exento de peróxidos, se añaden 500 ml de tampón de acetato sódico 4 N, pH 5.51 (véase apartado 2.2.4.2) y se elimina totalmente el aire del recipiente mediante el paso de una corriente de nitrógeno puro a una presión de 0.5 - 1.0 atm.

El análisis de aminoácidos básicos se lleva a cabo en columnas de 23 x 0.9 cm cargadas hasta una altura de 6 cm con resina Beckman tipo AA-27, suspendida en un tampón de citrato sódico 0.35 N, pH 5.28, que se prepara disolviendo en un volumen final de 20 l 686.3 g de citrato sódico $2H_2O$, 130 ml de HCl concentrado, 40 ml de disolución de Brij-35 y 2 ml de ácido n-caprílico. El desarrollo se efectúa únicamente con este tampón en las mismas condiciones que para el análisis de aminoácidos ácidos y neutros. (500).

2.2.6. Análisis cuantitativo de aminoácidos libres.

2.2.6.1. Preparación de las muestras.

Para el análisis automático de aminoácidos libres de hígado se han empleado las mismas preparaciones que para la valoración de aminoácidos totales (véase apartado 2.2.4.1.).

Para preparar el suero para su análisis se ha desproteinizado con ácido pícrico. Para ello, el suero se mezcla con 5 volúmenes de una disolución acuosa de ácido pícrico al 1% y se agita hasta obtener una precipitación completa. El precipitado se separa por centrifugación y el sobrenadante se deposita sobre una columna de 20 X 2 cm cargada con Dowex 2 X 10 en forma Cl^- hasta una altura de 2 cm. La resina se usa suspendida en agua y, una vez introducida la muestra, se lava la columna cinco veces con 3 ml de HCl 0.02 N. El eluyente y lavados se concentran en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se disuelve en tampón de citrato sódico 0.2 N, pH 2.2.

2.2.6.2. *Análisis automático de aminoácidos libres.*

El análisis cuantitativo automático de aminoácidos se ha llevado a cabo también con ayuda de un analizador Beckman modelo Unichrom. Para el análisis de aminoácidos ácidos y neutros se han utilizado columnas idénticas a las descritas para el caso de hidrolizados de proteínas, con la salvedad de que la resina estaba suspendida en un tampón de citrato sódico 0.20 N, pH 3.18. La elución se comienza con este tampón a 34° y a los 103 minutos de desarrollo se eleva la temperatura hasta 63°. A los 163 minutos el tampón se sustituye por otro de citrato sódico 0.20 N, pH 4.25, cuya preparación se ha descrito anteriormente. Durante todo el análisis se mantiene el flujo de tampón de elución a 50 ml/hora y a 25 ml/hora el de reactivo de ninhidrina.

El análisis de aminoácidos básicos se efectúa en una columna de 29 x 0.9 cm con un lecho de resina de 22 cm de altura. El tampón de equilibrio -y primero de elución- es en este caso de citrato sódico 0.38 N, pH 4.26. Para prepararlo se disuelven en un volumen final de 20 l 745.0 g de citrato sódico $2\text{H}_2\text{O}$, 304.5 ml de HCl concentrado, 40 ml de disolución de Brij-35 y 2 ml de ácido n-caprílico. La columna se termostatiza inicialmente a 33° y a los 185 minutos de desarrollo se eleva la temperatura hasta 55° y se cambia el tampón de elución por otro de concentración 0.35 N y pH 5.28, cuya preparación se ha descrito anteriormente. Durante todo el desarrollo se mantienen a 50 y 25 ml/hora los flujos de tampón de elución y de reactivo de ninhidrina respectivamente. (501).

2.2.7. Electroforesis de proteínas de suero.

2.2.7.1. *Electroforesis en gel de acetato de celulosa.*

Se han utilizado membranas de acetato de celulosa Sepraphore (Gelman) que, antes de la aplicación de la muestra, se humedecen en el tampón que, posteriormente, se ha de utilizar en el desarrollo. Este se prepara a partir de veronal, con una fuerza iónica de 0.1 M y pH 8.6 según el siguiente esquema:

Veronal sódico	29.4 g
Acetato sódico	19.4 g
HCl 0.1 N	180.0 ml
H ₂ O	hasta 3 l

Sobre la tira de gel humedecida se aplican 2 µl de suero en una línea, situada aproximadamente a 5 cm de uno de los extremos de la misma. Los dos depósitos de la cubeta de electroforesis se llenan con el tampón de veronal arriba descrito y se da comienzo al desarrollo pasando una corriente de 0.25 mA por cada cm de longitud de la membrana.

Al cabo de dos horas, las membranas se retiran de la cubeta y se tiñen en una disolución de Rojo Ponceau S (0.2 g del colorante y 3 g de ácido tricloroacético en 100 ml de agua) durante 15-20 minutos. Al cabo de este tiempo las membranas se decoloran por inmersión en ácido acético 5% (3 baños de 10 minutos). Terminada esta operación las tiras de electroforesis se transparentan sumergiéndolas en un baño formado por 8 volúmenes de diacetonalcohol, 35 de metanol, 5 de ácido acético y 50 de agua, después de lo cual se calientan en estufa a 60° durante 5-10 minutos (502). Para obtener un registro -utilizable con fines cuantitativos- de la distribución de bandas a lo largo de la tira de electroforesis se densitometran en un fotómetro registrador Photovolt.

2.2.7.2. *Electroforesis en gel de poliacrilamida.*

La electroforesis en gel de poliacrilamida se ha desarrollado siguiendo la técnica de Davis y Ornstein (503). Se ha empleado un aparato Polyanalyst (Buchler Instruments Inc.) y tubos de 10 cm de longitud y 6 mm de diámetro interno.

Los geles se preparan a partir de las siguientes disoluciones:

- | | |
|--|--------------|
| A. HCl 1 N | 48.0 ml |
| Tris base | 36.6 g |
| TEMED (*) | 0.23 ml |
| H ₂ O | hasta 100 ml |
| B. HCl 1 N | 48 ml |
| Tris base | 5,98 g |
| TEMED | 0,46 ml |
| H ₂ O | hasta 100 ml |
| C. Acrilamida | 28.0 g |
| Bisacrilamida | 0.735 g |
| H ₂ O | hasta 100 ml |
| D. Acrilamida | 10.0 g |
| Bisacrilamida | 2.5 g |
| H ₂ O | hasta 100 ml |
| E. Riboflavina al 0.004% en agua | |
| F. Sacarosa al 40% (p/v) en agua | |
| G. Persulfato amónico al 0.14% en agua | |

Manteniendo los tubos en posición vertical y tapados por su extremo inferior se llenan hasta una altura de 6 cm con una disolución formada por una parte de A, dos de C, una de agua y cuatro de G y se dejan en esa posición hasta que el gel polimeriza. Para evitar que la parte superior del gel quede cóncava, es conveniente añadir, antes de que comience la polimerización, un pequeño volumen de agua en cada tubo, de forma que la interfase entre ella y la disolución anterior sea plana. Si esta operación se realiza cuidadosamente, la superficie superior del gel es plana y puede retirarse el agua sin dificultad después de la polimerización. Se añade entonces una disolución formada por una parte de B, dos de D, una de E y cuatro de F en cantidad suficiente para ocupar una altura de 1.5 cm en los tubos. Estos se iluminan verticalmente con luz fluorescente hasta conseguir una polimerización completa (habitualmente se requieren 30-45 minutos), tomando las precauciones descritas anteriormente para evitar la concavidad del menisco.

(*) N, N, N', N'- tetrametiletildiamina.

Los tubos se montan entonces en la cubeta de electroforesis y se llenan los dos compartimentos con un tampón de pH 8.3 que contiene 6 g de tris y 28.8 g de glicocola por litro.

El suero, en cantidad tal que las proteínas de la muestra no sobrepasen los 200 µg, se deposita en la parte superior de los tubos mezclado con un volumen igual de la disolución F y se da comienzo al desarrollo haciendo pasar una corriente de 2 - 5 mA por cada tubo. Para tener una idea aproximada de la duración de la electroforesis se añaden al depósito superior unas gotas de disolución de azul de bromofenol. En las condiciones experimentales expuestas este colorante, cuya banda es visible en su desplazamiento a través del gel, tiene una movilidad ligeramente superior a la de la albúmina, por lo que se interrumpe el paso de la corriente cuando la banda del colorante llega a 0.5 cm del extremo inferior del gel.

Los geles se extraen de los tubos con ayuda de una aguja hipodérmica larga y se introducen durante 6 horas en un baño de Negro Amido al 1% en ácido acético del 7%. Para eliminar el exceso de colorante los geles se lavan con ácido acético al 7% o, mejor, se introducen de nuevo en la cubeta de electroforesis, esta vez en tubos de 7 mm de diámetro interno, se llenan los dos depósitos con la disolución de ácido acético y se hace pasar una corriente de 5 mA/tubo hasta que el desteñido sea completo. Una vez desteñidos, los geles se pueden conservar en ácido acético al 5% y se registra la intensidad de las bandas con un densitómetro Gelman.

2.3. ESTUDIO DEL METABOLISMO DE GLICOCOLA EN PRESENCIA DE AMITROL.

2.3.1. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales.

2.3.1.1. *Incubaciones con homogeneizados de hígado de cobaya.*

Todos los homogeneizados descritos en este apartado en el medio fisiológico Krebs-Ringer-NaHCO₃ (504). Este medio se prepara a partir de las siguientes disoluciones:

- a) NaCl 0.90% (0.154 M)
- b) KCl 1.15% (0.154 M)
- c) CaCl₂ 1.22% (0.110 M)
- d) KH₂PO₄ 2.11% (0.154 M)
- e) MgSO₄·7H₂O 3.82% (0.154 M)
- f) NaHCO₃ 1.30% (0.154 M)

La disolución f) se gasea durante una hora a 37° con CO₂ puro y a continuación se mezclan 100 partes de la disolución a) con 4 de la b), 3 de la c), 1 de las disoluciones d) y e) y 21 de la f).

La mezcla se gasea a 37° con O₂-CO₂ (95:5) durante 10 minutos y se guarda en frío hasta su uso.

El hígado de los animales se extrae rápidamente después de su muerte por dislocación cervical, se extirpa la vesícula biliar, se trocea y se lava en medio Krebs-Ringer y, después de secado entre papeles de filtro se homogeneiza con el mismo medio (2.5 ml por gramo de tejido) en un Omni-Mixer (Sorvall) a 200 V durante 2 minutos. Todas las operaciones se realizan a 0-4° y el homogeneizado se utiliza inmediatamente después de su obtención.

Con homogeneizados preparados de esta forma se han llevado a cabo cuatro experiencias distintas, cuyas diferencias se ponen de manifiesto en la descripción siguiente.

1ª Experiencia.

La mezcla de incubación se obtiene añadiendo a 2 ml de homogeneizado 1 µCi de glicocola-1-¹⁴C (0.1 µmol) disuelta en medio Krebs-Ringer. El amitrol se añade disuelto en el mismo medio hasta alcanzar una concentración final de 0.1 M. El volumen total que se completa con medio Krebs-Ringer en las muestras de control es de 2.5 ml.

Las muestras así preparadas (dos de control y otras dos con amitrol) se incuban con agitación a 37° durante 40 minutos, al cabo de los cuales la reacción se detiene por adición de 2.5 ml de ácido tricloroacético al 10% frío.

El precipitado se separa por centrifugación a 3.000 rpm en una centrifuga Martin Christ "Piccolo" y a partir de él se aíslan las proteínas por el método de Siekevitz (apartado 2.1.2.3). El sobrenadante se somete a un proceso de extracción continua con éter para eliminar el ácido tricloroacético, hasta que el pH sube a 4-5, después de lo cual se aplican muestras de 20-50 µl a lo largo de una línea de 2.5 cm en papel Whatman n° 1 y se realiza una cromatografía descendente en butanol-acetona-agua-dietilamina (20:20:10:3) (505). Los cromatogramas se secan y se determina la distribución de productos radiactivos mediante un contador 4π de Baird-Atomic, modelo 435, que trabaja con flujo continuo de gas "Q" (mezcla helio-isobutano, 95:5). El contador está acoplado a un registro gráfico que suministra la

curva de actividad en función de la distancia migrada en el cromatograma. Estos, después de contados, se revelan con ninhidrina al 0.2% en etanol de la forma habitual.

2ª Experiencia.

La mezcla de incubación de control contiene, en un volumen final de 4.65 ml, 4 ml de homogeneizado de hígado de cobaya, obtenido de la forma descrita y 3.5 μCi de glicocola-1- ^{14}C (0.35 μmoles). Otras muestras contienen, además, ácido fólico con una concentración final de 4.3 $\mu\text{moles/ml}$. En todos los casos se desarrollan en paralelo muestras por duplicado, con amitrol (concentración final 0.05 M) y sin él.

La incubación se realiza en vasijas provistas de rama lateral en las que el compartimento principal está ocupado por el homogeneizado y - en su caso - por ácido fólico, mientras que el resto de los reactivos se depositan en la rama lateral. Después de equilibrar ambos compartimentos a 37°, la reacción se inicia mezclando sus contenidos y se continúa a la misma temperatura durante 3 horas. Al cabo de este tiempo se detiene por adición de 20 ml de etanol absoluto a -10°. Se dejan las muestras durante una noche en nevera y se centrifugan para separar el precipitado. Este se lava con etanol del 96%, que se mezcla con el sobrenadante anterior, y a continuación con ácido tricloroacético al 10%. A partir de este precipitado lavado, se aíslan las proteínas por el método de Siekevitz.

De la mezcla de sobrenadante y lavado se elimina el etanol por destilación a presión reducida y, posteriormente, se concentra hasta 1-2 ml en desecador en vacío sobre P_2O_5 a temperatura ambiente. La disolución, turbia por la presencia de lípidos solubles en etanol, se clarifica por extracción con 0.5 ml de cloroformo. La fase acuosa se separa por centrifugación y se somete a cromatografía de la misma forma que en la experiencia 1.

3ª Experiencia.

El medio de incubación contiene en un volumen final de 2.65 ml, 2 ml de homogeneizado y 2 μmoles de glicocola-1- ^{14}C (2.8 μCi). Además de las muestras con ácido fólico solo (3.8 $\mu\text{moles/ml}$) se preparan otras que contienen además formaldehído (0.009 M). Todas las muestras se incuban por duplicado con y sin amitrol y la reacción se detiene con etanol en la forma descrita. En esta experiencia la cromatografía se ha efectuado, además en capa fina de celulosa. Las placas se preparan en la forma indicada en el apartado 2.2.5 y se desarrollan en una dirección con el primer sistema

de disolventes. Una vez secas, las placas se cuentan en un contador "Duo Scan 1" (Baird Atomic) que proporciona, mediante un registro X-Y, la localización de las zonas radiactivas sobre la placa y permite el contaje posterior de cada zona por separado. Después de esta operación, las placas se revelan con ninhidrina en la forma habitual.

4^a Experiencia.

En un volumen final de 2.65 ml la muestra de control tiene 2 ml de Homogeneizado, 1.1 μ moles de glicocola-1-¹⁴C (2.1 μ Ci) y 10 μ moles de ácido tetrahidrofólico. Al mismo tiempo se preparan otras tres muestras que contienen amitrol, también disuelto en medio Krebs-Ringer, para dar concentraciones finales de 0.5, 2.5 y 5.0 $\cdot 10^{-2}$ M respectivamente. Todas las muestras se incuban en matraces erlenmeyer de 10 ml durante 4 horas a 37° en un armario termostatzado New Brunswick, modelo R26, con agitación.

La reacción se detiene por coagulación de las proteínas, introduciendo los matraces, tapados por esferas de vidrio colocadas sobre su boca, en baño de agua hirviendo durante 4 minutos. El precipitado se separa por centrifugación y el sobrenadante se deposita cuantitativamente sobre una columna de Dowex 50, X 4 (forma H⁺) de 20 X 1.5 cm. La columna se lava con 200 ml de agua destilada y se eluye con 300 ml de NH₄OH 2 N. El eluido se lleva a sequedad en un evaporador rotatorio bajo vacío y el residuo se redisuelve en 1 ml de agua destilada. Se toman 30 ml de esta disolución y se aplican a lo largo de una línea de 1.5 cm sobre placas de celulosa que se desarrollan, cuentan y revelan del mismo modo que en la experiencia 3.

2.3.1.2. Incubación con homogeneizados de hígado de rata.

Los animales se sacrifican por dislocación cervical y el hígado se extrae rápidamente y se lava en tampón fosfato potásico 0.10 M, pH 7.6, después de lo cual se homogeneizan en 5 volúmenes del mismo tampón con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón. El tampón fosfato se prepara mezclando 87 ml de K₂HPO₄ 0.2 M con 13 ml de KH₂PO₄ y diluyendo la mezcla a 200 ml.

La mezcla de reacción se prepara en tubos de centrífuga de 15 ml con 1 ml de homogeneizado, 0.4 μ moles de glicocola-1-¹⁴C (2 μ Ci) y a la mitad de las muestras se añade amitrol disuelto en agua hasta alcanzar una concentración final de 5 $\cdot 10^{-3}$ M, completando en las muestras de control el volumen final de 1.2 ml con agua destilada. Las mezclas se incuban a 37° en un armario termostatzado New Brunswick modelo R26 con agitación durante una

hora y la reacción se detiene por coagulación de las proteínas, según la técnica descrita en el apartado anterior (experiencia 4). Se toman 50 μ l del sobrenadante que se depositan sobre columnas de 7 X 0.9 cm cargadas con Dowex 50 X 2, de 200-400 mallas, en forma H^+ y suspendida en agua. Las columnas se lavan con 50 ml de agua y se eluyen con otros 50 de NH_4OH 2 N. Tanto el agua de lavado (fracción no retenida), como el eluido con amoníaco (fracción retenida) se llevan a sequedad en evaporador rotatorio bajo vacío y se redisuelven en 0.2 ml de agua y se cromatografían en capa fina y en papel del mismo modo que en las experiencias 3 y 1, respectivamente, del apartado anterior. De igual forma, se somete a cromatografía en papel una alícuota de 25 μ l del sobrenadante que no se ha purificado previamente por cambio de ión. Después de esto se procede al contaje de los cromatogramas -de papel y capa fina- en la forma descrita anteriormente.

2.3.2. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales de animales tratados con amitrol.

En estas experiencias en vez de añadir amitrol al medio de incubación "in vitro" se ha utilizado hígado de animales tratados. El tratamiento se ha efectuado sobre ratas machos de peso comprendido entre 185 y 300 g (media de 245 g) que han recibido amitrol (lg/Kg) en 9 dosis a lo largo de 35 días, en la forma indicada en el apartado 2.2.1. Al cabo de este tiempo tanto las ratas tratadas con amitrol, como las de control, se sacrifican y sus hígados se extraen y homogeneizan en medio de Krebs-Ringer como se ha indicado en el apartado 2.3.1.1.

La mezcla de reacción contiene en todos los casos 2 ml de homogeneizado, 1.1 μ moles de glicocola-1- ^{14}C (2.1 μ Ci) y 10 μ moles de ácido tetrahidrofólico, en un volumen final de 2.75 ml. La incubación, desproteinización y marcha posterior de la experiencia se ha realizado de modo análogo a la cuarta descrita en 2.3.1. 1, salvo que el tiempo de reacción ha sido de dos horas.

2.3.3. Experiencias con preparados enzimáticos purificados.

2.3.3.1. Aislamiento de L-serina:tetrahidrofólico-5,10-hidroximetiltransferasa.

Se ha aislado del hígado de ratas normales y tratadas con amitrol la L-serina:tetrahidrofólico-5,10-hidroximetiltransferasa (EC 2.1.2.1) por el método de Blakley (506). La enzima cataliza la conversión de glicocola en

serina en presencia de ácido tetrahidrofólico y formaldehído.

Las ratas se sacrifican por decapitación sin anestesia y el hígado se extrae rápidamente y se lava en tampón de fosfato potásico 0.1 M, pH 7.5 a 0°. Posteriormente se homogeneiza en el mismo tampón (1 ml/g de hígado) en un Potter-Elvehjem con émbolo de teflón. El homogeneizado se diluye 10 veces y se centrifuga a 4.300 g durante una hora. El sobrenadante se lleva inmediatamente a 53° se mantiene a esta temperatura durante 10 min y se enfría después en agua helada. Se centrifuga nuevamente a 4.300 g durante 30 min y al sobrenadante claro se añade $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.75 M ajustado a pH 7.5 con NH_4OH hasta concentración final de 1,47 M. Después de dejar la mezcla 3 horas en frío, el precipitado se separa por centrifugación y se desecha. Al sobrenadante se vuelve a añadir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la misma forma hasta concentración final de 2.06 M. El precipitado se recoge por centrifugación, se lava con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.06 M pH 7.5, se disuelve en un pequeño volumen de tampón fosfato 0,01 M pH 7,5, se dializa frente a 100 volúmenes de tampón fosfato 0.02 M, pH 7,5 durante 3 horas y, posteriormente, durante otras 3 horas frente a tampón fosfato 0,001 M pH 6.3. Se valoran las proteínas en una alícuota de la disolución resultante por el método de Lowry (474) y el resto se guarda a -20° hasta su utilización.

2.3.3.2. Síntesis enzimática de serina

Se ha seguido una técnica semejante a la de Blakley (506) en cuanto a la composición del medio de incubación, pero con diferencias considerables respecto a la valoración de serina sintetizada.

La reacción se lleva a cabo en un aparato de Warburg, en vasijas de 25 ml provistas de rama lateral. En el compartimento principal se disponen 0.1 ml del preparado enzimático, 0.1 ml de NaHCO_3 0.12 M, 0.1 ml de una disolución de fosfato de piridoxal (1.49 mg/ml) y 0.8 ml de ácido tetrahidrofólico (0.86 mg/ml). En la rama lateral se colocan 0.1 ml de glicocola 1.35 M y 0.05 ml de una disolución 0.27 M de formaldehído, recientemente preparada. Se desplaza el aire del sistema mediante el paso de $\text{N}_2\text{-CO}_2$ (95:5) durante 30 minutos con agitación, al propio tiempo que la temperatura se equilibra a 37°. Una vez realizada esta operación se cierran las vasijas y se da comienzo a la reacción mezclando el contenido de ambos compartimentos y se continúa durante una hora. La incubación se termina por adición de 0.1 ml de ácido perclórico al 70% frío, se deja estar la vasija a 0-2° durante 30 minutos y se centrifuga para eliminar el precipitado de

proteína que se desecha. Se toma 1 ml del sobrenadante que se mezcla con una cantidad igual de tampón citrato 0.2 N, pH 2.2 (496), cuya preparación se ha descrito en el apartado 2.2.4.1, y se valora cuantitativamente la serina formada en un analizador de aminoácidos Beckman modelo Unichrom, siguiendo la técnica expuesta en 2.2.6. En este caso sólo es necesario utilizar el primer tampón, dado el tiempo de elución de la serina.

Del resto del sobrenadante se toma una alícuota de 10 μ l que se cromatografía en capa fina del modo habitual.

2.4. TECNICAS DE ESTUDIO DEL METABOLISMO DE AMITROL.

2.4.1. Investigación de metabolitos de amitrol.

2.4.1.1. *Procedimientos cromatográficos.*

Los derivados de amitrol, presentes en los diversos tejidos o excreciones de los animales tratados se han investigado, en general, mediante diversas técnicas cromatográficas y se ha comparado su comportamiento con el de los derivados aislados de vegetales o microorganismos.

Los procedimientos cromatográficos más empleados han sido la cromatografía en papel (Whatman n° 1) ascendente o descendente y la cromatografía en capa fina de celulosa (Macherey-Nagel, MN 300, con un espesor de capa de 0.25 mm en húmedo).

Los sistemas de disolventes utilizados en tales cromatografías han sido:

Sistema A: Butanol-etanol-agua (52.5:32:15.5) (9).

Sistema B: Isopropanol-hidróxido amónico-agua (6:2:2) (9).

Sistema C: Piridina-agua (8:2) (16).

Sistema D: Isopropanol-hidróxido amónico-agua (80:5:15) (16).

Sistema E: Metiletilcetona-metanol-agua (25:50:25) (507).

Como reveladores se han empleado:

a) Ninhidrina al 0.2% en etanol.

b) Reactivo "H" de Racusen (véase apartado 2.2.5)

c) Reactivo de Ehrlich (508), compuesto por:

p-dimetilaminobenzaldehído 0.5 g

HCl concentrado1.0 ml

Etanol del 96%100 ml

2.4.1.2. Valoraciones de amitrol.

Para valorar amitrol en muestras biológicas se han utilizado alternativamente los siguientes procedimientos colorimétricos:

a) Método de Kröller (97).

Se mezclan 2 ml de la disolución problema con 0.3 ml de HCl 1 N y 0.2 ml de NaNO_2 0.01 M. Se agita y se calienta la disolución al 50° durante 15 minutos. Se añaden en este momento 0.4 ml de NaOH 1 N, 1 ml de una disolución de bórax al 5% y, finalmente, 0.2 ml de una disolución de la sal disódica del ácido 8-amino-1-naftol-3,6-disulfónico^(*) al 0.1%. Se agita hasta conseguir una mezcla total y se deja estar la disolución a temperatura ambiente. Después de 5 minutos se añaden 0.5 ml de ácido ascórbico al 2% y al cabo de 10 minutos se mide la absorbancia a 525 nm frente a un blanco, desarrollado de igual forma, en el que el problema se sustituye por agua destilada.

La sensibilidad es de 0.05 g/ml si la medición se efectúa en cubetas de 2 cm de paso óptico.

b) Método de Green y Feinstein (509).

Se mezclan volúmenes iguales de problema y ácido tricloroacético al 5% y se filtra en caso de aparecer precipitado. A 5.0 ml de disolución clara se añade 1.0 ml de NaNO_2 0.01 M y se mezcla bien. Se adiciona a continuación 1.0 ml de ácido cromotrópico (3,6 -disulfo-1,8-dihidroquinaftaleno) 0.0025 M recientemente preparado y, después de agitar, se coloca la disolución en baño María hirviendo durante 2.5 minutos. Los tubos se enfrían inmediatamente en baño de hielo y se mide la absorbancia a 525 nm frente a un blanco en el que el problema se sustituye por agua.

En algunos casos se ha utilizado una modificación original del método de Green y Feinstein que consiste en sustituir el ácido cromotrópico por ácido "H" (8-amino-1-naftol-3,6-disulfónico). El procedimiento se desarrolla de igual forma, pero la lectura ha de hacerse a 475 nm, como se justificará en la parte 3 de esta memoria.

(*) Se ha utilizado un producto de la casa Fluka, purificado mediante conversión en el ácido libre y recristalización de agua de este último.

2.4.1.3. *Cromatografía automática de cambio de ión de derivados de amitrol.*

Los derivados de amitrol que dan reacción positiva con ninhidrina se pueden someter a cromatografía automática de cambio de ión en un analizador de aminoácidos Unichrom por cualquiera de los procedimientos indicados anteriormente.

Para determinar el volumen de elución del amitrol en las condiciones en que se analizan sus derivados se ha aprovechado su reacción con el reactivo de Ehrlich. El amitrol se disuelve en tampón citrato 0.2 N, pH 2.2 a una concentración de 10 mg/ml y se aplica 0.5-1.0 ml de esta disolución a las columnas que se eluyen de la misma forma en que se hayan cromatografiado los derivados de amitrol. En lugar del reactivo de ninhidrina se dispone otro compuesto por 0.5 g de p-dimetilaminobenzaldehído disuelto en 100 ml de una mezcla 1:1 de etanol del 96% y tampón citrato 0.2 N, pH 3.18. El flujo de este reactivo se mantiene a la misma velocidad que el de ninhidrina en un análisis normal y la elución del amitrol puede seguirse en el registro correspondiente al colorímetro de 440 nm.

2.4.1.4. *Análisis de la orina de los animales tratados.*

Para investigar la presencia de derivados de amitrol en orina, se recoge ésta a lo largo del tratamiento, se filtra y se depositan 10-15 ml sobre una columna de 25 X 3.5 cm cargada con Amberlita IR-120 en forma H^+ . La columna se lava con 50 ml de agua y después se eluye con NH_4OH 2 N. El eluido se lleva a sequedad a presión reducida y se redisuelve en 1-2 ml de agua destilada.

Para muestras de orina obtenidas en menor cantidad (alrededor de 1 ml) se han utilizado columnas de 10 X 0.9 cm cargadas con Dowex 50 X 2 que se lavan y eluyen de la misma manera. Una vez realizadas estas operaciones, la orina se somete a los procedimientos analíticos indicados precedentemente.

2.4.1.5. *Análisis de muestras de tejidos de animales tratados.*

Para investigar la presencia de amitrol o sus derivados en los diversos tejidos de animales tratados se ha seguido el mismo método de preparación de muestras que para el análisis de aminoácidos libres. En algunas ocasiones, sin embargo, la precipitación de proteínas se ha llevado a cabo con ácido tricloroacético en vez de perclórico. En estos casos el ácido tricloroacético se elimina por extracción con éter como se ha explicado anteriormente.

2.4.1.6. Estudio del metabolismo del amitrol "in vitro".

Para estudiar los productos del metabolismo del amitrol en sistemas acelulares de mamíferos se mezclan 10 ml de homogeneizado de hígado de cobaya (preparado según el método de 2.3.1.1.) con 2 ml de amitrol 0.625 M disuelto en medio Krebs-Ringer. La mezcla se incuba a 37° durante una hora y se detiene la reacción con 5 ml de ácido tricloroacético al 10% frío. El precipitado de proteínas se separa por centrifugación y se desecha y el ácido tricloroacético se elimina del sobrenadante por extracción con éter. El sobrenadante neutro se lleva a sequedad bajo vacío en un evaporador rotatorio, se redisuelve en una pequeña cantidad de agua y se cromatografía como se ha indicado en el apartado 2.4.1.1.

2.4.2. Obtención de metabolitos de amitrol.

Se han aislado, a efectos de comparación con los detectados en mamíferos, a partir de vegetales y microorganismos.

2.4.2.1. *Derivados de amitrol en vegetales.*

Se han obtenido a partir de plantas de alubias (*Phaseolus vulgaris*) tratadas con amitrol.

Las semillas se dejan a 25° en la oscuridad sobre papel de filtro húmedo hasta que germinan y en ese momento se plantan, a 1 cm de profundidad, en arena lavada que se riega con agua todos los días y se mantiene en las mismas condiciones hasta que brotan las plántulas. A partir de este momento el cultivo se expone a la luz durante 9-10 horas diarias y se riega con el medio hidropónico de Shive que se prepara a partir de las siguientes disoluciones:

KH_2PO_4	49.00 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	24.56 "
MgSO_4	73.95 "

Para ello se mezclan 50 ml de cada disolución, se añaden 4-5 mg de fosfato férrico y se completa el volumen a 1.000 ml.

Cuando han aparecido las hojas primarias se comienza el tratamiento con amitrol, que se pulveriza a diario sobre las plantas en disolución acuosa al 2%. El tratamiento se suspende cuando comienza a apreciarse clorosis y antes de que aparezcan zonas de necrosis sobre las hojas se cortan éstas, junto con los meristemos, y se congelan en aire líquido.

A continuación se sigue una modificación del procedimiento de extracción de Massini (16). Las plantas congeladas se homogeneizan durante un minuto con etanol del 70% en una proporción de un litro por cada 50 plantas, en un Omni-Mixer (Sorvall) en vasijas de 1.5 l que se mantienen abiertas y sumergidas en baño de agua a 80°. El homogeneizado se filtra por un tejido de nylon y el residuo se extrae dos veces durante una hora con agua (500 ml por cada 50 plantas) a 50° y con agitación.

Los extractos se reúnen y se centrifugan durante una hora a 500 g. El sobrenadante se concentra en vacío, se ajusta su pH a 2.0 con HCl, se centrifuga una hora a 12.000 g y se guarda a 0-5° hasta su utilización (extracto I).

Se realizan las mismas operaciones con un cultivo, desarrollado simultáneamente y con la misma técnica pero sin tratar con amitrol, que sirve de control en las experiencias subsiguientes.

Para someter el extracto I a cromatografía de papel o capa fina se purifica previamente 1 ml del mismo a través de una columna de Dowex 50 X4 (200-400 mallas) en forma H^+ y suspendida en agua. La columna se lava con agua hasta que el eluido sea totalmente incoloro y a continuación se desplaza con NH_4OH y se concentra la disolución amoniaca en vacío.

Para separar, con fines preparativos, los derivados de amitrol se ha seguido parcialmente el método de Massini (16). Se utiliza una columna de 20 X 0.8 cm cargada con Amberlita CG 120. La resina se usa en forma NH_4^+ y tamponada con formiato amónico a pH 2.1 que se prepara mezclando volúmenes iguales de ácido fórmico 0.5 N y amoniaco 0.01 N. Una alícuota del extracto I, correspondiente a 10 plantas, se absorbe sobre la columna que se eluye con el mismo tampón de formiato amónico al que se va añadiendo gradualmente NH_4OH 0.5 N. En algunas ocasiones, para obtener un gradiente de pH menos pronunciado, se añade NH_4OH 0.1 N.

El eluido se recoge, a velocidad de 15 ml/hora, en fracciones de 2 ml, con ayuda de un colector LKB. Se toma una gota de cada fracción, se deposita sobre papel de filtro y se comprueba la presencia de derivados de amitrol revelando el papel con reactivo "H" (apartado 2.2.5).

Una vez realizada esta cromatografía preliminar, y para proceder a un aislamiento en gran escala, se emplea una técnica semejante, pero la columna se sustituye por otra de 20 X 3.5 cm que se carga y eluye de igual forma, recogiendo fracciones de 10 ml.

Las fracciones que dan mancha roja con el reactivo "H" contienen derivados de amitrol. Se concentran en un evaporador simultáneo "Evapomix" (Büchler) y se someten a cromatografía ascendente sobre papel con los sistemas de disolventes indicados anteriormente. Las fracciones correspondientes a un mismo derivado se reúnen y se purifican por cromatografía en una columna de celulosa de 20 X 1 cm. La columna se carga con polvo seco en la proporción de 1 g de celulosa por 2 cm³ de columna (510) y se lava con el disolvente de elución (ordinariamente los sistemas A o B descritos en 2.4.1.1) hasta que se obtenga un eluido incoloro. La disolución que se desea cromatografiar se aplica en la columna mezclada con una pequeña cantidad de polvo de celulosa (510) y la elución se efectúa con el mismo disolvente, recogiendo fracciones de 1-2 ml. El derivado de amitrol se localiza con el reactivo "H" como en la cromatografía anterior se recupera por evaporación del disolvente y, si es necesario, se recristaliza. Esta operación de purificación se ha realizado en algunos casos en pequeña escala mediante cromatografía preparativa en papel Whatman n° 3MM.

2.4.2.2. Derivados de amitrol en microorganismos.

Se ha utilizado para obtenerlos un cultivo de *Escherichia coli* 26-26, auxótrofo de lisina.

El microorganismo se conserva en un medio sólido de agar, del que se transfiere a otro líquido de siembra compuesto por:

K_2HPO_4	7.0 g/l
KH_2PO_4	3.0 "
Citrato sódico	0.5 "
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 "
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 "

que se esteriliza previamente en autoclave a 0.5 atm durante 20 minutos.

Después de la esterilización se añade al medio, bajo luz ultravioleta, glucosa y L-lisina hasta alcanzar concentraciones de 10 y 0.040 g/l respectivamente (511). El microorganismo se mantiene en incubación a 30° sin agitación durante 8-10 horas, al cabo de las cuales se inocula la siembra anterior al 5% en un segundo medio que contiene:

Sacarosa	15.0 g/l
Glicerina	15.0 "
Acido láctico	4.0 "
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	15.0 "
Na_2HPO_4	5.0 "
Na_2SO_4	0.1 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 "

que se esteriliza en autoclave a 110° durante 20 minutos y se suplementa, como en el caso anterior, con 0.1 g de L-lisina por litro (511).

El cultivo se desarrolla entonces a 30° en vasijas cilíndricas de 100 ml, dotadas de indentaciones, que se agitan, en dirección perpendicular a su eje a una velocidad de 60 ciclos por minuto (512).

El crecimiento del microorganismo se sigue midiendo la turbidez en un turbidímetro Lange, después de diluir 20 veces una muestra del cultivo.

Para obtener los metabolitos del amitrol producidos por este microorganismo se ha planteado una experiencia en la que se cultiva simultáneamente en 10 fermentadores, 9 de los cuales contienen amitrol al 0.1%, quedando el décimo como control del crecimiento normal. A las 21 horas del cultivo (fase de lisis en un cultivo normal) se añade a dos fermentadores adenina e histidina (0.05% de cada una) y serina (0.05%) a otros dos. Al final de la incubación las células se separan por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 0-4°.

La misma operación se realiza con muestras del medio de cultivo que se toman a lo largo del mismo y los sobrenadantes se cromatografían en capa fina de celulosa del modo expresado en el apartado 2:2.5, aunque sólo se utiliza el primer sistema de disolventes.

El total de los medios de cultivo, una vez eliminadas las células, se deposita sobre columnas de Zeo-Karb 215 (30 X 0.5 cm), que se lavan con agua y eluyen posteriormente con NH_4OH 1 N. El eluido se concentra bajo vacío y se guarda para comparaciones cromatográficas con los derivados de amitrol obtenidos de mamíferos.

2.4.3. Espectroscopía infrarroja de derivados de amitrol.

2.4.3.1. *Obtención de espectros.*

Se han obtenido espectros infrarrojos de los derivados de amitrol, después de purificados y cristalizados en la forma descrita en el apartado an

terior. Se ha utilizado indistintamente la suspensión en nujol y pastillas de KBr. Al objeto de asignar con más facilidad ciertas bandas se han estudiado también los espectros de derivados acetilados sintéticos de amitrol, cuya obtención se detalla en el apartado siguiente.

2.4.3.2. Síntesis de 1-acetilamitrol y 3-acetilamitrol.

El 1-acetilamitrol se ha sintetizado por el método de Staab y Seel (513). Se agitan a temperatura ambiente 1.05 g de amitrol (Koch-Light, recristalizado de etanol) y 0.49 g de cloruro de acetilo en 125 ml de tetrahidrofurano anhidro durante 20 horas. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se filtra, se elimina el disolvente por destilación en vacío a 30-40° y el residuo se recristaliza de benceno anhidro. Rendimiento 91%. P. F. 150°.

El 3-acetilamitrol se sintetiza por transposición del derivado 1-acetilado. Para ello se calienta éste durante 7 minutos en tubo cerrado en vacío a 190°. Se obtiene, con un 100% de rendimiento, 3-acetilamitrol. P.F. 287-8° (513).

Para obtener directamente el derivado acetilado en 3 se ha seguido el método de Fredrick y Gentile (22). Se calientan a reflujo en baño de vapor durante una hora 10 g de amitrol y 50 ml de anhídrido acético. Después se vierte la mezcla de reacción sobre 50 ml de agua a 0°. Se filtra a la trompa, se disuelven los cristales en agua caliente y se trata la disolución con 1 g de carbón activo, hirviendo durante 3-5 minutos. Se filtra después para eliminar el carbón activo y se enfría en nevera durante 6 horas. Los cristales se recogen por filtración y secan sobre P_2O_5 en vacío.

2.5. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD Y PATOGENICIDAD DEL AMITROL.

Además del control de peso de los animales tratados con amitrol se han realizado una serie de pruebas histológicas que se detallan a continuación.

2.5.1. Análisis de sangre.

Se obtiene sangre de los animales tratados por punción cardiaca y se determina en ella el contenido de hematíes y leucocitos por recuento microscópico.

2.5.2. Estudio microscópico de tejidos.

Se han realizado en hígado, (lóbulo piramidal), bazo, intestino y médula ósea.

Para ello se fijan muestras de los tres primeros tejidos inmediatamente después de la muerte del animal en etanol-ácido acético 3:1, se deshidratan con etanol acuoso y después con etanol absoluto y se incluyen en parafina. Los cortes de la inclusión se tiñen por métodos convencionales y se obtienen microfotografías con ayuda de un microscopio Zeiss con cámara fotográfica incorporada.

La médula ósea se obtiene a partir del fémur de los animales inmediatamente después de su muerte. Se extiende sobre un portaobjetos, se tiñe con Azur Eosina (Giemsa) y se observa en la forma descrita anteriormente.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La presente investigación se comenzó con el estudio de los efectos del amitrol sobre la biosíntesis de proteínas tanto en sistemas acelulares como "in vivo". En el esquema de la figura 5 se recoge el planteamiento inicial de la investigación. En las diversas secciones de esta tercera parte de la memoria se irán anotando los resultados obtenidos según dicho planteamiento, así como las experiencias que para poner de manifiesto el significado de algunos de ellos, se han realizado de modo adicional al esquema indicado.

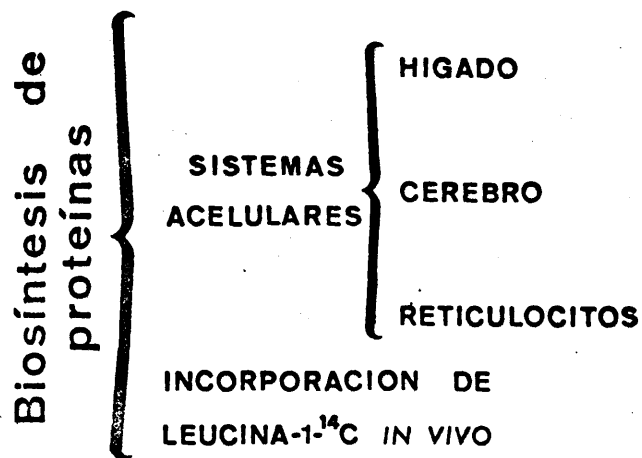


Figura 5

3.1. BIOSINTESIS DE PROTEINAS EN SISTEMAS ACELULARES.

3.1.1. Determinación de actividad de aminoácido: tRNA ligasas.

3.1.1.1. *Preparación de ATP- γ - ^{32}P .*

El ATP- γ - ^{32}P se sintetizó conforme se ha indicado en la sección 2.1.5.1. y su pureza radioquímica se determinó mediante cromatografía en papel y posterior autorradiografía (figura 6). Puede observarse en ella que existe un único producto marcado, cuyo R_f coincide con el del ATP. No se observa actividad en las zonas correspondientes al ADP y AMP.

No obstante, la conservación del ATP- γ - ^{32}P en disolución a 0-5° durante largo tiempo conduce a una descomposición parcial. Se ha investigado este extremo por cromatografía de alícuotas de una disolución de ATP- γ - ^{32}P (3.0 mCi/mmol) a los 18 y 48 días de su preparación. Después de realizada la cromatografía el ATP se eluyó con 5 ml de HCl 0.1 N y se determinó su actividad específica. En la tabla IX se encuentran los resultados de esta determinación. La segunda columna indica la actividad específica real mientras que la tercera da cuenta de la esperada, teniendo en cuenta la desintegración del ^{32}P , cuyo periodo es de 14,3 días.

TABLA IX

DESCOMPOSICION DEL ATP- γ - ^{32}P DURANTE SU CONSERVACION

<u>Tiempo (días)</u>	<u>S (*)</u>	<u>S Teórica (**)</u>	<u>Pérdida de S</u>	<u>Descomposición de ATP (%)</u>
0	3.00	-	-	-
18	1.14	1.26	0.12	9.5
48	0.01	0.29	0.28	96.6

(*) Actividad específica en mCi/mmol.

(**) Actividad específica corregida por la desintegración del ^{32}P .



ATP-³²P

³²P

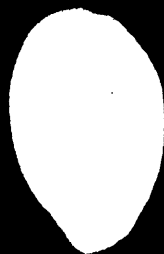


Figura 6

A la vista de esta tabla es evidente la necesidad de emplear el ATP lo antes posible después de su preparación, con el fin de asegurar la pureza del material utilizado.

El mismo procedimiento cromatográfico es válido para investigar la pureza química del ATP sintetizado. Un cromatograma de ATP, revelado por fotografía con luz ultravioleta (figura 7) no permite descubrir más manchas que las correspondientes a este trifosfato, sin que aparezcan trazas de ADP ni AMP.

3.1.1.2. Puesta a punto del método.

Este nuevo método, cuyos detalles experimentales se han expuesto en la sección 2.1.5.2 se puso a punto con una fracción enzimática pH 5, obtenida de hígado de cobaya según la modificación de Schweet (481) descrita en el apartado correspondiente. El espectro ultravioleta de la fracción enzimática se recoge en la figura 8. La relación D_{260}/D_{280} , calculada a partir de él, es de 1.33, lo que indica una proporción tRNA/proteína relativamente elevada y conforme con los datos bibliográficos.

La composición de la mezcla de incubación es esencialmente la descrita en la literatura para la realización del intercambio ATP-PP en presencia de pirofosfato marcado. La presencia de iones F^- es necesaria para inhibir la acción de la pirofosfatasa.

Se comprobó que el volumen óptimo de aplicación para la cromatografía, en orden a la obtención de cromatogramas cuantitativamente reproducibles es de 10 μ l. En estas condiciones puede lograrse que la mancha de ATP tenga una superficie inferior a la de la ventana del tubo Geiger empleado (1") (figura 9).

La detección por fotografía en las condiciones expuestas es más sensible que la simple inspección visual del cromatograma bajo luz ultravioleta. Sin embargo, al utilizar papel cromatográfico no tratado las manchas de ATP aparecen sobre un fondo que denota una ligera absorción de luz por parte del papel. La cantidad normal de aplicación permite destacar claramente las manchas, pero la absorción de fondo puede, no obstante, impedir que el contorno de ellas aparezca nítido. Esta absorción de fondo se debe a la presencia de iones metálicos y desaparece totalmente cuando se utiliza papel lavado previamente con disolución de EDTA. Es también importante eliminar trazas de iones metálicos del sistema de desarrollo y a este objeto obedece también la presencia de EDTA en el disolvente empleado. Obrando de esta manera, las

Figura

7

ATP*

ATP

ADP

AMP

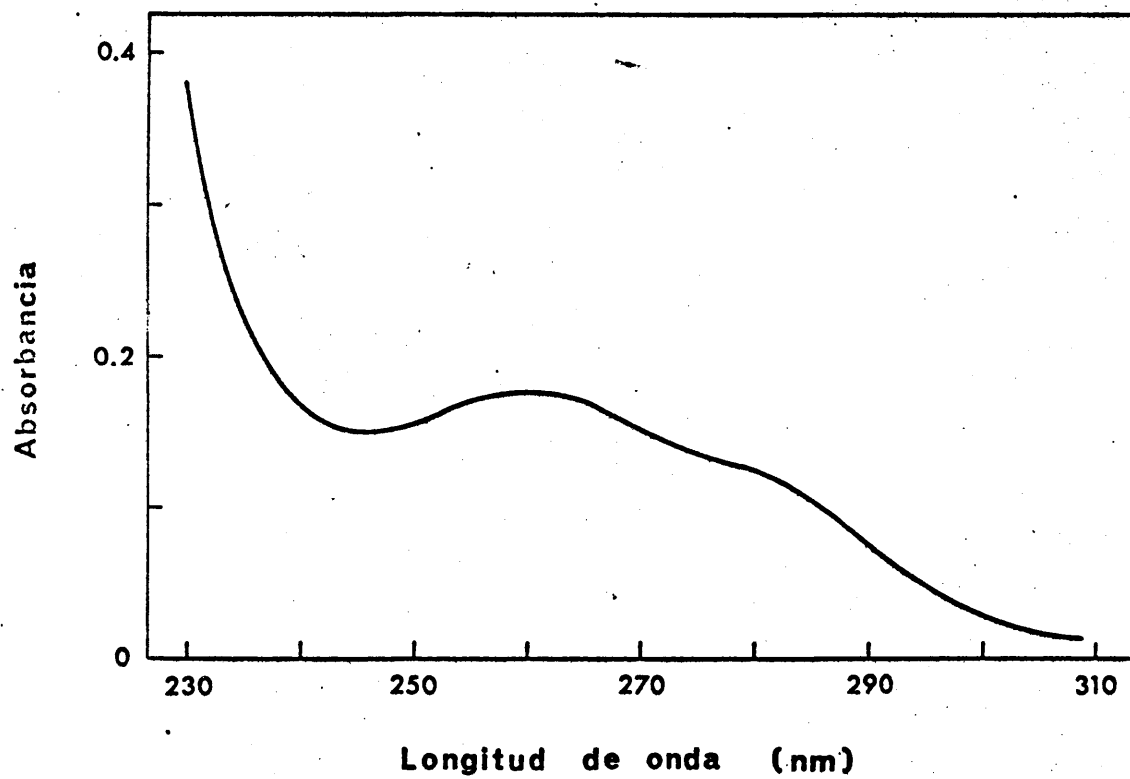
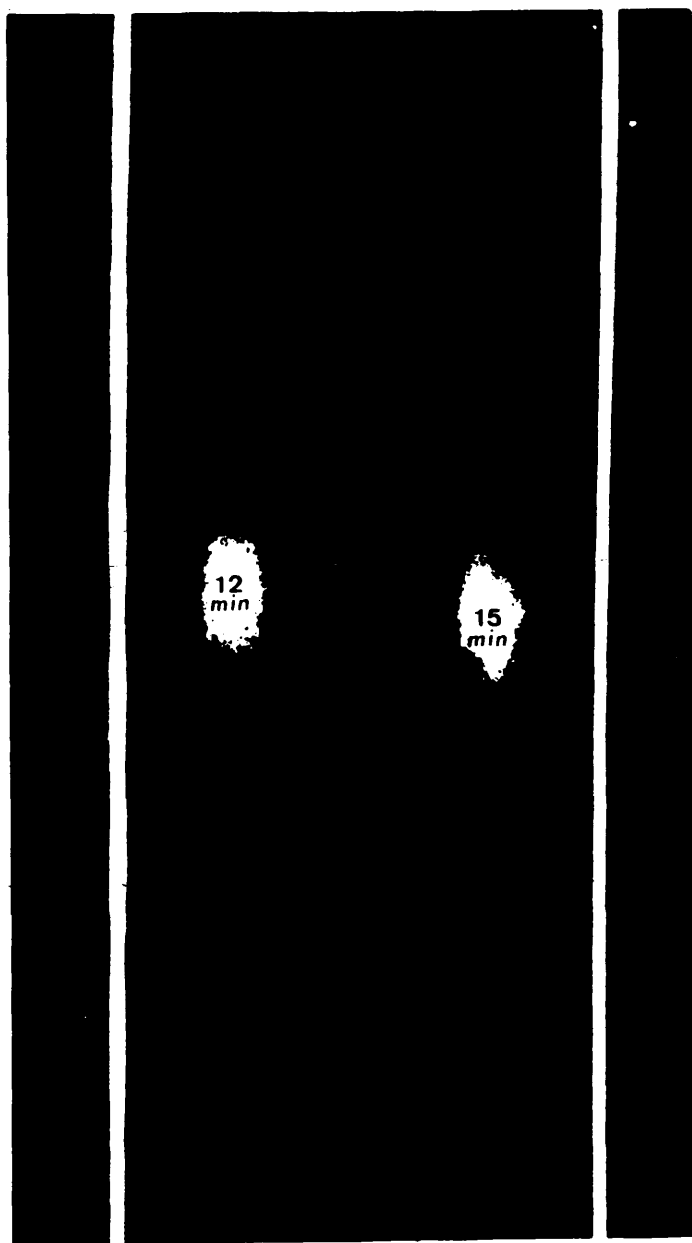


Figura 8



0 1 2 3 4 5 CM.

Figura 9

manchas de ATP aparecen definidas con suficiente nitidez para delimitar su contorno (figura 9).

La primera experiencia, cuyos resultados se indican en la tabla X se realizó exclusivamente para comprobar la validez del método. De estos resultados se desprende que el intercambio ATP-PP realizado en los

TABLA X
INTERCAMBIO ATP-PP EN PRESENCIA DE FRACCION
ENZIMATICA pH 5 DE HIGADO DE COBAYA

<u>Tiempo (minutos)</u>	<u>Actividad del ATP (cpm)</u>
0	1.239
2	1.280
4	1.171
6	1.163
9	1.099
11	1.055
15	951
25	884
34	769

34 min. de reacción fue de un 42%, concordante con el observado por los otros métodos disponibles.

Los resultados sólo indican realmente que la actividad total del ATP ha disminuido. Para que pueda hablarse de intercambio ATP-PP será menester demostrar que la actividad específica también disminuye, es decir que la desaparición de actividad total se debe a la introducción de PP normal como una consecuencia de la reacción de intercambio y no a la destrucción del ATP en el transcurso de la incubación.

Con este fin, después del conteo se eluyeron las manchas de ATP con 5 ml. de HCl 0.1 N y se determinó la absorbancia de todas las muestras a 260 nm en cubeta de 1 cm de paso óptico. En la tabla XI se recogen los resultados de esa valoración. Puede observarse que, prácticamente la concentración de ATP es constante a lo largo de toda la reacción o, lo que es lo mismo, que la disminución de actividad se debe realmente a un proceso de intercambio.

TABLA XI

<u>Tiempo (min.)</u>	<u>Abs. 260 nm</u>
0	0.201
2	0.225
4	0.227
6	0.218
9	0.215
11	0.212
15	0.225
25	0.220

Así pues, en lo sucesivo, todos los resultados se expresarán como pérdida de actividad total. lo que, dada la constancia de concentración del ATP, equivale a hablar de pérdida de actividad específica.

3.1.1.3. Crítica del método.

El presente método, como todos los que siguen el intercambio ATP-PP por técnicas isotópicas, es más sensible que los que valoran la activación de aminoácidos por obtención de hidroxamatos y determinación colorimétrica cuantitativa de estos últimos.

Todas las técnicas isotópicas descritas en la bibliografía parten de ATP normal y pirofosfato marcado y estudian la aparición de actividad en ATP. Por el contrario, el método presente procede en sentido inverso. Su ventaja principal estriba en que la reacción se sigue por desaparición de actividad de ATP, lo que permite conseguir, con menos dificultad, actividades elevadas en los primeros instantes de la reacción, con el consiguiente aumento de precisión en el estudio de su iniciación.

La separación de los productos de reacción por cromatografía sobre papel se ha empleado ya por otros autores, aunque siguiendo técnicas distintas (véase, por ejemplo, la referencia 514). Sus ventajas sobre la separación por adsorción sobre carbón activo son evidentes, tanto en orden a la sencillez del método, como por la escasa cantidad de mezcla de incubación requerida, lo que permite seguir su curso a lo largo del tiempo, aún partiendo de muestras reducidas.

3.1.2. Sistema acelular de hígado de cobaya.

3.1.2.1. *Biosíntesis total de proteínas.*

Se han realizado tres experiencias, dos de ellas con leucina y otra con histidina como precursor isotópico. Las diferencias entre las dos experiencias con leucina estriban en el lavado de los ribosomas (superficial o por resuspensión) y en la adición de bentonita en una de ellas en el medio de preparación de los ribosomas.

1ª Experiencia.

Se obtuvieron ribosomas de hígado de cobaya según el método detallado en el apartado 2.1.2.1, con adición de bentonita para inactivar la ribonucleasa. La eliminación de desoxicolato se efectuó mediante lavado superficial del sedimento ribosomal. La fracción enzimática "pH 5" se preparó según se ha descrito en 2.1.2.2; la disolución final se valoró por el método de Lowry, después de realizar una estimación previa de su contenido de proteínas según se ha indicado en el apartado 2.1.1. La concentración resultó ser de 8.0 mg/ml, por lo que al añadir 0.1 ml de este preparado a la mezcla de incubación se entraba dentro de los límites requeridos (véase 2.1.2.3).

La incubación se realizó con leucina- l - ^{14}C y al fin de la misma, antes de proceder al contaje, se pesaron todas las muestras. En ninguna de ellas la cantidad de proteínas fue suficiente para alcanzar el espesor infinito, por lo que aplicó la corrección de autoabsorción mediante la fórmula (484):

$$S = \frac{\mu}{A} \frac{I}{1 - e^{-\mu h}}$$

en la que S es la actividad específica de la proteína, μ la constante de absorción, A es la superficie de la plancheta, I la actividad medida y h el espesor (mg/cm^2) de la muestra radiactiva.

El valor de la constante μ se calculó gráficamente a partir de los datos de Campbell y Sargent (483), resultando un valor de 0.213. De esta forma se ha construido la columna 5ª de la tabla XII, a partir de los datos experimentales reseñados en columnas anteriores.

TABLA XII

INFLUENCIA DEL AMITROL EN LA INCORPORACION DE LEUCINA-1-¹⁴C A PROTEINAS

SISTEMA ACELULAR DE HIGADO DE COBAYA

Muestra	Sistema	Espesor (mg/cm ²)	Actividad medida (cpm)	Actividad específica cpm/mg	Valores medios
1	Control	9.0	202	151	
2	Control	7.1	198	163	151
3	Control	12.9	207	140	
4	AT 6.10 ⁻³ M	8.4	178	139	
5	AT 6.10 ⁻³ M	9.0	174	131	135
6	AT 10 ⁻² M	13.5	193	129	
7	AT 10 ⁻² M	14.1	180	118	123

2ª Experiencia.

Se realizó una nueva preparación de ribosomas y de fracción enzimática "pH 5" y una nueva incubación con objeto de estudiar la influencia del amitrol sobre la incorporación a proteínas de histidina-2'-¹⁴C. Los resultados están recogidos en la tabla XIII. Se ha incluido en ella el resultado del conteo de una incubación de control realizada con leucina-1-¹⁴C en las mismas condiciones.

TABLA XIII

INFLUENCIA DEL AMITROL SOBRE LA INCORPORACION DE HISTIDINA-2'-¹⁴C

A PROTEINAS

SISTEMA ACELULAR DE HIGADO DE COBAYA

Muestra	Actividad (cpm)*
Control	330 ± 3
AT, 10 ⁻² M	35 ± 4
Control leucina	229 ± 16

* Todas las muestras se contaron a es
pesor infinito.

La diferencia entre la incorporación de leucina y de histidina es 16 gica si se tiene en cuenta que el primer aminoácido es unas 5 veces más abundante que la histidina en las proteínas de hígado.

3ª Experiencia.

Los ribosomas se prepararon sin bentonita, pero se lavaron por resuspensión según la modificación descrita en el apartado correspondiente. El espectro ultravioleta de este preparado registrado frente a un blanco de medio A, exhibió una meseta entre 260 y 280 nm, con una relación A_{260}/A_{280} de 1.18.

Con estos preparados se llevó a cabo una nueva experiencia de incorporación de leucina- $1-^{14}\text{C}$. Se incubaron por duplicado muestras de control y, al mismo tiempo, se determinó la influencia del amitrol en intervalos de concentración no cubiertos por las experiencias anteriores. Los resultados se recogen en la tabla XIV en la que se incluyen los intervalos de error estadístico del conteo para un margen de seguridad del 95%.

TABLA XIV

INFLUENCIA DEL AMITROL EN LA INCORPORACION DE LEUCINA- $1-^{14}\text{C}$ A PROTEINAS

SISTEMA ACELULAR DE HIGADO DE COBAYA

<u>Muestra n°</u>	<u>Contenido</u>	<u>Actividad (cpm)*</u>
1	Control	642 ± 21
2	Control	618 ± 19
3	AT, $1.35 \cdot 10^{-5}\text{M}$	612 ± 20
4	AT, $1.35 \cdot 10^{-5}\text{M}$	574 ± 20
5	AT, $5.00 \cdot 10^{-3}\text{M}$	629 ± 21

* Todas las muestras se contaron a espesor infinito.

3.1.2.2. Activación de aminoácidos.

Con la misma preparación enzimática "pH 5" utilizada en la primera experiencia descrita en el apartado anterior, se realizaron tres incubaciones con objeto de investigar la influencia del amitrol en varias concentraciones sobre la activación de aminoácidos. Los resultados se exponen en las tablas XV y XVI y en la figura 10.

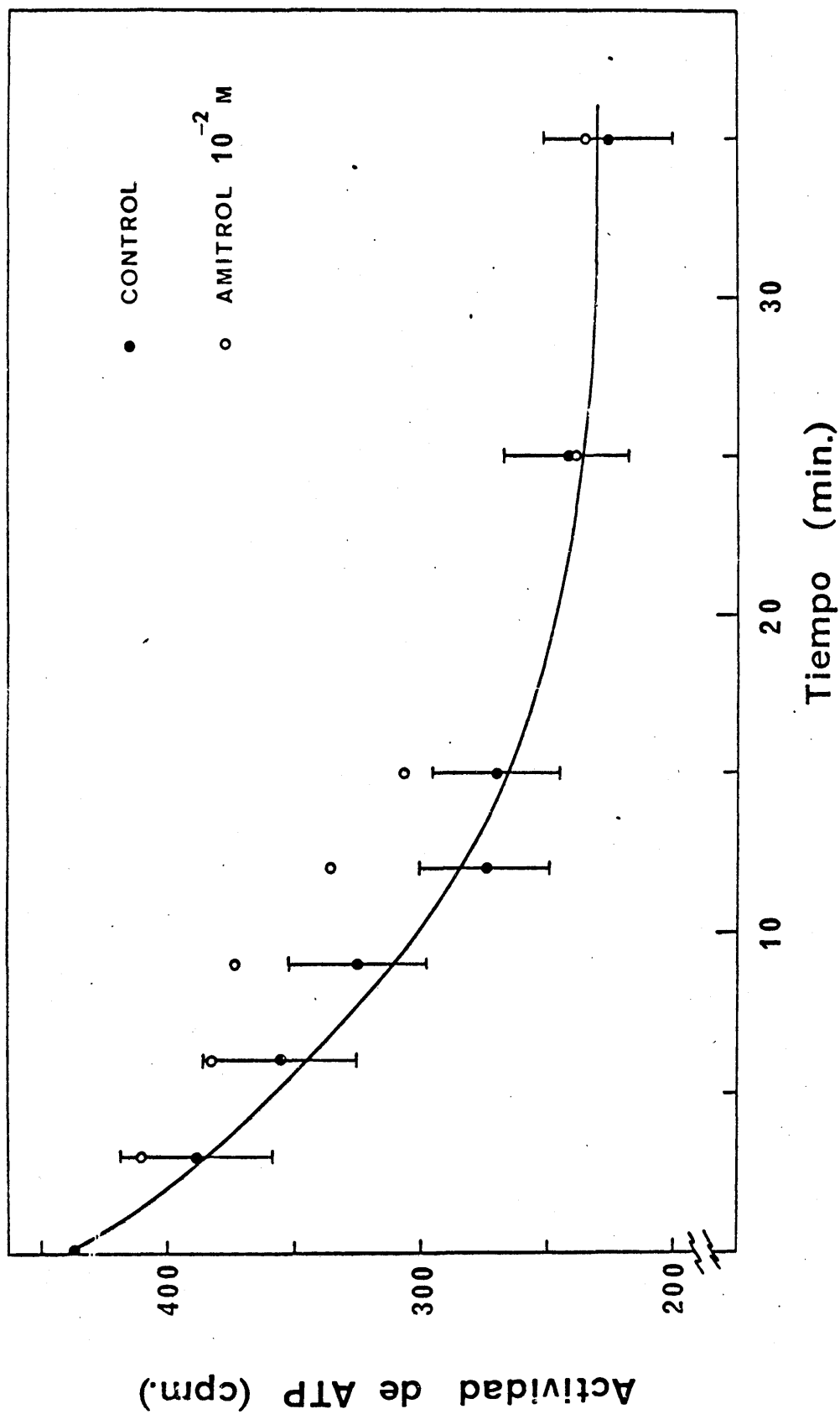


FIGURA 10.- Influencia del amitrol 10^{-2} M sobre la activación de aminoácidos con enzimas pH 5 de hígado de cobaya.

TABLA XV

INFLUENCIA DEL AMITROL $10^{-2}M$ SOBRE LA ACTIVACION DE AMINOACIDOS
(1^a Incubación)

Tiempo (min)	Actividad del ATP (cpm)	
	Control	AT, $10^{-2}M$
0	439	439
3	387	410
6	357	383
9	325	373
12	275	336
15	271	308
25		240
35	225	237
% de intercambio	49	46

(2^a Incubación)

0	527	527
3	491	513
6	452	476
9	431	467
12	372	398
25	329	354
40	292	327
% de intercambio	45	38

TABLA XVI

INFLUENCIA DEL AMITROL $5 \cdot 10^{-3}$ Y $2 \cdot 10^{-2}$ M-SOBRE LA ACTIVACION DE AMINOACIDOS

Tiempo (min)	Actividad del ATP (cpm)		
	Control	AT, $5 \cdot 10^{-3}$ M	AT, $2 \cdot 10^{-2}$ M
0	507	507	507
5	474	501	516
10	458	459	480
15	400	437	---
25	375	424	426
35	313	357	347
% de intercambio	38	30	32

3.1.2.3. Discusión.

El rendimiento de la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas puede considerarse normal en las dos primeras experiencias y bueno en la tercera. Según Fruton (515), en las condiciones de incubación que utilizan sistemas acelulares sólo suele aparecer en las proteínas alrededor del 1% de la actividad del aminoácido marcado. La actividad de los aminoácidos marcados añadidos a la mezcla de incubación fue constante en todos los casos y, medida en las mismas condiciones que las proteínas arrojó un valor de 23.500 cpm (se ha aplicado la corrección de coincidencia).

Esto supone un rendimiento aproximado del 1% para la incorporación de leucina en la primera experiencia y de casi un 3% en la tercera. La única diferencia entre ambas experiencias fue el método de preparación de los ribosomas. En la tercera, aunque no se incluyó bentonita en el medio, los ribosomas se lavaron por resuspensión, con lo que puede afirmarse que el desoxicolato sódico se eliminó prácticamente de modo total. Parece pues, a la luz de los resultados consignados en las tablas XII y XV, que la presencia de desoxicolato reduce notablemente la incorporación de aminoácidos a proteínas, mientras que la inhibición debida a la posible presencia de ribonucleasa es menos importante.

El amitrol parece inhibir, aunque muy ligeramente, la incorporación

de aminoácidos en este sistema acelular. Esta disminución en la incorporación sólo es apreciable -debido al mayor nivel de incorporación- en las experiencias realizadas con leucina y entre ellas se observa con más claridad en la primera (Tabla XII). De todas formas la inhibición es pequeña. La incorporación de leucina en presencia de una concentración relativamente elevada de amitrol ($10^{-2}M$) es el 83% de la de control. Si se compara esta escasa reducción con cualquiera de los ejemplos expuestos al tratar de la inhibición de la biosíntesis de proteínas, se puede apreciar que el amitrol no puede considerarse plenamente como inhibidor.

En todo caso, las experiencias de activación de aminoácidos parecen indicar que la pequeña inhibición provocada por el amitrol se encuentra en esta etapa previa de la biosíntesis de proteínas. El método empleado para investigarla, que como ha quedado dicho es especialmente apto para seguir los primeros instantes de la reacción, permite detectar un retraso inicial en ella (figura 10), si bien al término de la misma el intercambio ATP-PP es prácticamente comparable tanto en presencia como en ausencia de amitrol.

Para reunir más datos sobre la posible acción inhibidora del amitrol en la síntesis de proteínas en sistemas acelulares, se plantearon las experiencias -con un sistema aislado de cerebro de conejo- que se describen a continuación.

3.1.3. Sistema acelular de corteza de cerebro de conejo.

3.1.3.1. *Biosíntesis total de proteínas.*

Por el método de Satake y col. (485) se obtuvieron ribosomas, fracción enzimática "pH 5" y fracción soluble a partir de corteza de cerebro de conejo. Estos autores describen también la preparación, a partir de cerebro de rata, de una fracción enzimática "pH 4.5", que se obtiene llevando el sobrenadante a este pH después de separar el precipitado formado a pH 5. En esta fracción "pH 4.5" se encuentran, en cerebro de rata, la mayor parte de las aminoácido : tRNA ligasas (516).

Partiendo de cerebro de conejo, sin embargo, no se obtuvo precipitado alguno a pH 4.5, por lo que para estudiar la actividad de ligasas se utilizaron las fracciones "pH 5" y soluble.

La concentración de proteínas se determinó por duplicado en muestras de estos preparados por el método colorimétrico de Lowry y resultó ser de 10 y 9.5 mg/ml, respectivamente. Ambos pudieron utilizarse, pues, sin

diluir en las incubaciones correspondientes. También se realizó el espectro ultravioleta de la fracción "pH 5" que presentó una meseta entre 255 y 280 nm y una relación A_{260}/A_{280} de 1.02.

Se llevó a cabo una experiencia de biosíntesis total de proteínas para estudiar la influencia del amitrol sobre la incorporación de leucina-1- ^{14}C e histidina-2'- ^{14}C . Los resultados se recogen en la tabla XVII en la que nuevamente puede apreciarse la lógica diferencia entre la incorporación de ambos aminoácidos.

TABLA XVII

INFLUENCIA DEL AMITROL 10^{-2}M EN LA INCORPORACION DE LEUCINA E HISTIDINA
A PROTEINAS

SISTEMA ACELULAR DE CORTEZA DE CEREBRO DE CONEJO

<u>Muestra n°</u>	<u>aa-^{14}C</u>	<u>Contenido</u>	<u>Actividad de las proteínas (cpm)*</u>
1	leucina	Control	190 ± 8
2	leucina	AT, 10^{-2}M	222 ± 9
3	histidina	Control	50 ± 3
4	histidina	Control	44 ± 3
5	histidina	AT, 10^{-2}M	41 ± 2
6	histidina	AT, 10^{-2}M	51 ± 3

* Todas las muestras se contaron a espesor infinito.

3.1.3.2. Activación de aminoácidos.

Se llevaron a cabo dos incubaciones en presencia de amitrol 10^{-2}M , una de ellas catalizada por la fracción "pH 5" (tabla XVIII) y la otra por la fracción soluble (tabla XIX).

TABLA XVIII

INFLUENCIA DEL AMITROL 10^{-2} M SOBRE LA ACTIVACION DE AMINOACIDOS POR
FRACCION ENZIMATICA "pH 5" DE CEREBRO DE CONEJO

<u>Tiempo (minutos)</u>	<u>Actividad del ATP (cpm)</u>	
	<u>Control</u>	<u>AT, 10^{-2} M</u>
0	338	338
3	281	300
6	270	269
9	250	268
12	250	243
27	202	209
40	175	188
% de intercambio	48	45

TABLA XIX

INFLUENCIA DEL AMITROL 10^{-2} M SOBRE LA ACTIVACION DE AMINOACIDOS POR
LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE CONEJO

<u>Tiempo (minutos)</u>	<u>Actividad del ATP (cpm)</u>	
	<u>Control</u>	<u>AT, 10^{-2} M</u>
0	971	971
3	936	926
6	923	880
9	871	878
12	870	846
25	839	---
35	---	853

3.1.3.3. *Discusión.*

De los resultados consignados en los apartados precedentes de esta sección puede concluirse que el amitrol no afecta la síntesis de proteínas en sistemas acelulares de cerebro. En este caso, no se aprecia siquiera el leve descenso observado en hígado de la biosíntesis total ni el retraso inicial en la activación de aminoácidos.

Del examen de los resultados de las tablas XVIII y XIX se desprende que la actividad de las aminoácido:tRNA ligasas es mayor en la fracción "pH 5" que en la fracción soluble. Más claramente puede apreciarse esta diferencia en la figura 11 en la que se ha representado el tanto por ciento de la actividad inicial que permanece en el ATP a lo largo del tiempo de incubación con enzimas "pH 5" y fracción soluble. Este hecho puede parecer contrario a los resultados de Satake y col. (516), según los cuales la actividad de ligasas es mínima en la fracción "pH 5", intermedia en la soluble y máxima en la "pH 4.5". No hay, sin embargo, contradicción, ya que, como se ha apuntado anteriormente, una vez separada la fracción "pH 5" no se forma precipitado al bajar el pH a 4.5. Esto, unido a la mayor actividad encontrada en la fracción "pH 5", sustenta la posibilidad de que, contrariamente a lo que ocurre en preparados de cerebro de rata, la mayor parte de las aminoácido: tRNA ligasas de cerebro de conejo precipitan a pH 5.

Para completar el estudio de la influencia del amitrol en la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares se escogió un nuevo sistema, obtenido de reticulocitos de conejo, como se expone en la sección siguiente.

3.1.4. Sistema acelular de reticulocitos de conejo.

3.1.4.1. *Preparación de las enzimas y tRNA.*

El sistema acelular de reticulocitos de conejo presenta la ventaja de que permite, prácticamente, el estudio de la biosíntesis de una proteína única, ya que más del 75% de la proteína sintetizada por los reticulocitos es hemoglobina.

Se eligió el método propuesto por Schweet y col. (487, 488) cuyos detalles experimentales se han expuesto anteriormente. La fracción enzimática, denominada por los autores "AS₇₀" se obtiene, después de separar el tRNA de la fracción soluble, por precipitación con sulfato amónico. En la presente investigación, con objeto de asegurar en todo momento la pureza de los preparados, se controló cada paso por espectrofotometría ultravioleta.

De esta forma se aseguró la total precipitación del tRNA con protamina. Esta proteína, debido a su escaso contenido de aminoácidos aromáticos, no presenta apenas absorción a 280 nm, lo que permite seguir la

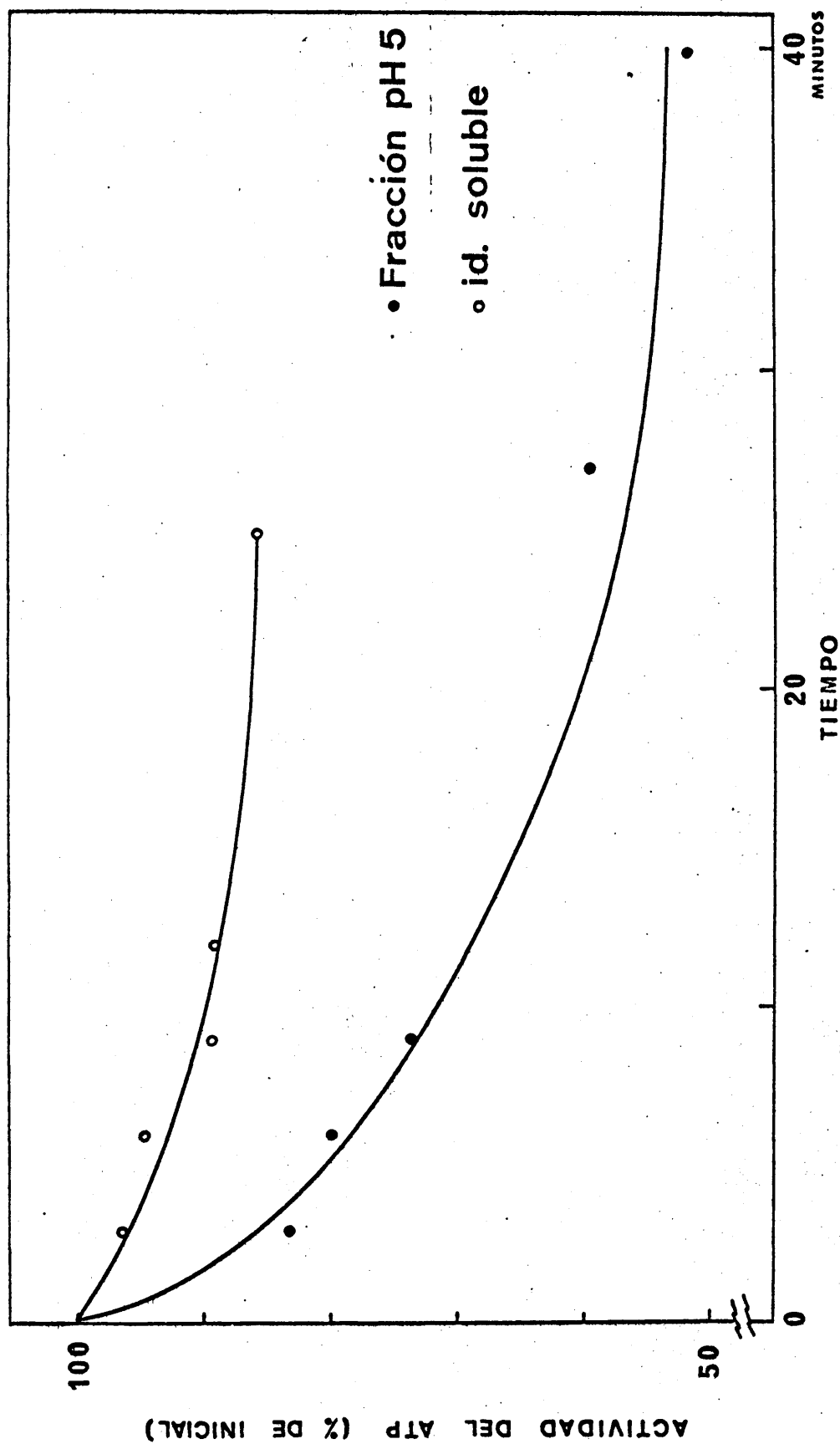


FIGURA 11.- Activación de aminoácidos en presencia de fracción enzimática pH 5
o de fracción soluble de cerebro de conejo.

precipitación del tRNA mediante la variación del cociente A_{280}/A_{260} . Se continuó añadiendo disolución de sulfato de protamina hasta constancia total de dicho cociente. En la tabla XX se puede observar la marcha de tal precipitación.

TABLA XX

PRECIPITACION DE tRNA CON SULFATO DE PROTAMINA

<u>N° de precipitaciones</u>	<u>A_{280}/A_{260}</u>
0	1.03
1	1.06
2	1.06
3	1.06

El tRNA se aisló del precipitado por extracción con fenol. Después de una primera extracción, el espectro ultravioleta de la fase acuosa (figura 12) denota la presencia de proteínas. En efecto, la falta de simetría del pico de 260 nm, con pendiente más suave hacia longitudes de onda mayores indica la presencia de proteínas citoplásmicas coprecipitadas por efecto de la acción de la protamina. En efecto, son estas proteínas las que en este momento pueden ser responsables de absorción a longitudes de onda superiores a 260 nm. Para eliminarlas totalmente se repitió la extracción con fenol, después de lo cual se precipitó el tRNA. El espectro de este preparado -realizado en la región de los 260 nm- exhibe un único pico, esta vez simétrico (figura 13). La relación A_{280}/A_{260} obtenida a partir de él, es de 0.5 y permite descartar la contaminación de proteínas.

La fracción "AS₇₀" se valoró por el método habitual, resultando una concentración de proteínas de 15 mg/ml, por lo que se tomaron 0.10 ml de este preparado para cada muestra de incubación.

La concentración del preparado de tRNA se evaluó directamente a partir de su espectro ultravioleta, utilizando un coeficiente de extinción de $\epsilon_{260}^{1\%} = 286$.

3.1.4.2. Biosíntesis total de proteínas.

Con el sistema acelular cuya preparación se acaba de discutir se realizó una experiencia de incorporación de leucina-1-¹⁴C e histidina-

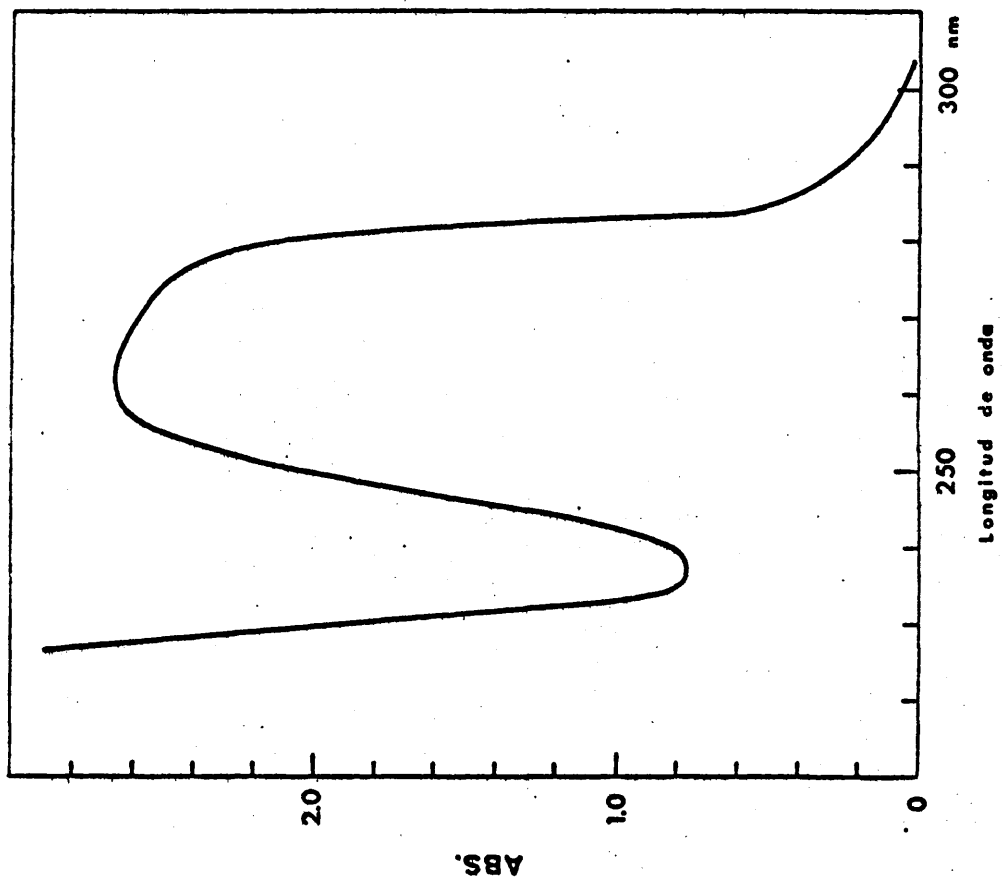


Figura 12

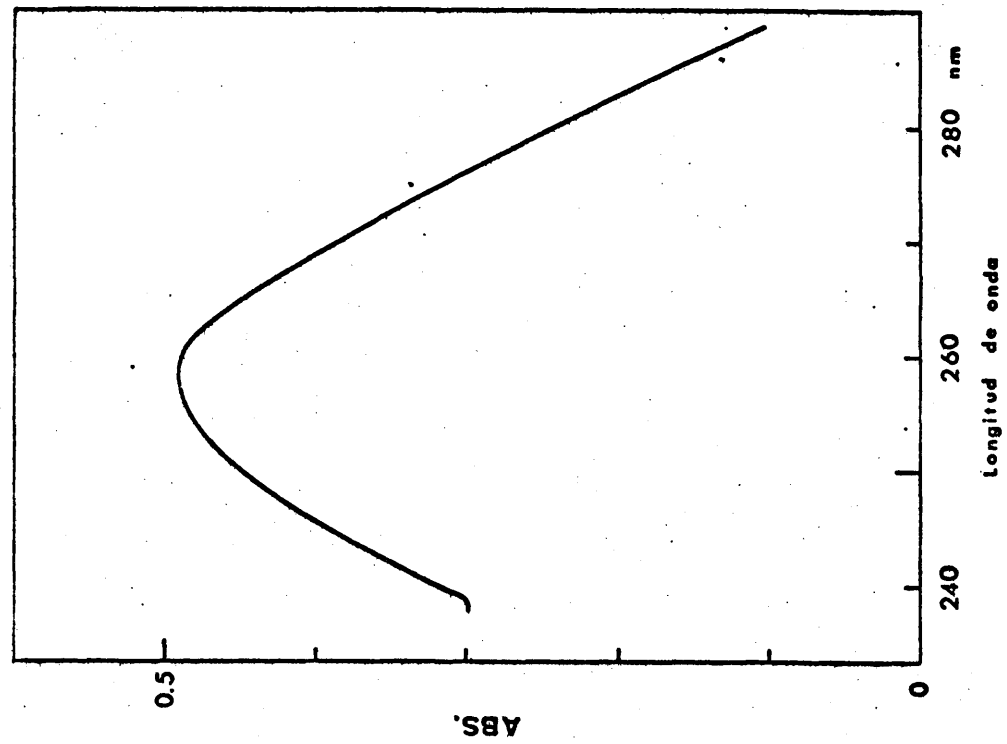


Figura 13

$2'-^{14}\text{C}$. Antes de proceder al conteaje de las muestras, se comprobó, como de costumbre, que todas cumplían la condición de espesor infinito. Los resultados, acompañados del intervalo estadístico para una seguridad del 95% se indican en la tabla XXI, en la que se aprecia, una vez más, la lógica diferencia entre la incorporación de ambos aminoácidos.

TABLA XXI

INFLUENCIA DEL AMITROL 10^{-2}M EN LA INCORPORACION DE LEUCINA E HISTIDINA
A PROTEINAS

SISTEMA ACELULAR DE RETICULOCITOS DE CONEJO

<u>Muestra n°</u>	<u>Aminoácido-^{14}C</u>	<u>Contenido</u>	<u>Actividad de la proteína (cpm)</u>
1	leucina	Control	132 ± 7
2	leucina	Control	136 ± 7
3	leucina	AT, 10^{-2}M	131 ± 6
4	leucina	AT, 10^{-2}M	137 ± 7
5	histidina	Control	24 ± 2
6	histidina	Control	25 ± 2
7	histidina	AT, 10^{-2}M	24 ± 2

3.1.5. Discusión general de las experiencias de biosíntesis en sistemas acelulares.

De los resultados consignados en apartados precedentes, se puede deducir que el amitrol no afecta apreciablemente el proceso de biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares. El hecho de que a concentraciones tan elevadas como 10^{-2}M sólo se aprecien ligeras disminuciones en la incorporación de aminoácidos es significativo a este respecto. Realmente no puede considerarse como inhibición auténtica esta disminución, que, por otra parte, sólo se aprecia en sistemas hepáticos.

El hecho de que no se aprecie retraso inicial en la activación de aminoácidos en sistemas de cerebro -en los que tampoco existe disminución alguna en la incorporación de aminoácidos- refuerza la hipótesis, anteriormente emitida, de que es en esa fase donde actúa el amitrol en los sistemas aislados de hígado.

Según Mann y col. (94), el amitrol no inhibe la biosíntesis "in vitro" de proteínas en vegetales, resultado que concuerda con los obtenidos en mamíferos en la presente investigación. Pero como también se ha apuntado en su momento, la aplicación de amitrol a vegetales "in vivo" reduce la concentración de proteínas en los tejidos afectados. Por este motivo, con el objeto de investigar si los efectos del amitrol en mamíferos son paralelos a los observados en vegetales, se realizaron experiencias de biosíntesis "in vivo" como se detalla en los apartados siguientes.

3.2. BIOSINTESIS DE PROTEINAS "IN VIVO".

3.2.1. Incorporación de leucina-1-¹⁴C.

En una primera experiencia se utilizaron ratas albinas hembras adultas con un peso medio de 215 g. Los animales se dividieron en tres grupos, de los cuales dos se trataron con amitrol en la forma descrita, con dosis de 1 y 2 g/kg respectivamente. El tercer grupo de control se trató como se ha indicado en la sección 2.2.1. La duración del tratamiento fue de 8 días en todos los casos.

Los animales recibieron inyección de amitrol (o de disolución salina los de control) los días 1°, 3°, 5° y 6°. El séptimo día fueron inyectados con leucina-1-¹⁴C (20 µCi/kg) en la forma descrita en 2.2.2. La actividad incorporada a las proteínas de hígado y bazo se detalla en la tabla XXII. No se incluyen en ella los datos referentes a la incorporación en proteínas de músculo y ovario -también determinada- por resultar valores prácticamente despreciables (inferior a 10 cpm).

TABLA XXII

INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA-1-¹⁴C EN PROTEINAS DE HIGADO Y BAZO DE RATA

<u>Grupo de animales</u>	<u>Actividad media de las proteínas (cpm)</u>	
	<u>Hígado</u>	<u>Bazo</u>
Control	32 ± 3	21 ± 1
AT, 1 g/kg	41 ± 2	29 ± 2
AT, 2 g/kg	43 ± 3	28 ± 1

Del examen de dicha tabla se desprende que si bien todos los valores resultan bajos, la actividad de las proteínas es superior en los animales tratados con amitrol. No se aprecian variaciones significativas entre los dos grupos de animales tratados, lo que parece indicar que los efectos del amitrol alcanzan valores de saturación para dosis iguales o inferiores a 1 g/kg.

A la vista de estos resultados pareció oportuno insistir en las experiencias de incorporación "in vivo" de aminoácidos, utilizando leucina de mayor actividad específica para obviar la baja incorporación.

En esta segunda experiencia el tratamiento con amitrol se llevó a cabo exclusivamente con dosis de 1 g/kg durante un periodo más prolongado, veinte días. Al final del mismo se inyectó leucina- $1-^{14}\text{C}$ (100 $\mu\text{Ci/kg}$) y se aislaron proteínas de hígado y suero. Los resultados se han recogido en la tabla XXIII.

TABLA XXIII

INCORPORACION "IN VIVO" DE LEUCINA- $1-^{14}\text{C}$ EN PROTEINAS DE HIGADO
Y SUERO DE RATA

<u>Grupo de animales</u>	<u>Actividad media de las proteínas (cpm)</u>	
	<u>Hígado*</u>	<u>Suero**</u>
Control	89 \pm 7	24 \pm 2
AT, 1 g/kg	109 \pm 8	44 \pm 3

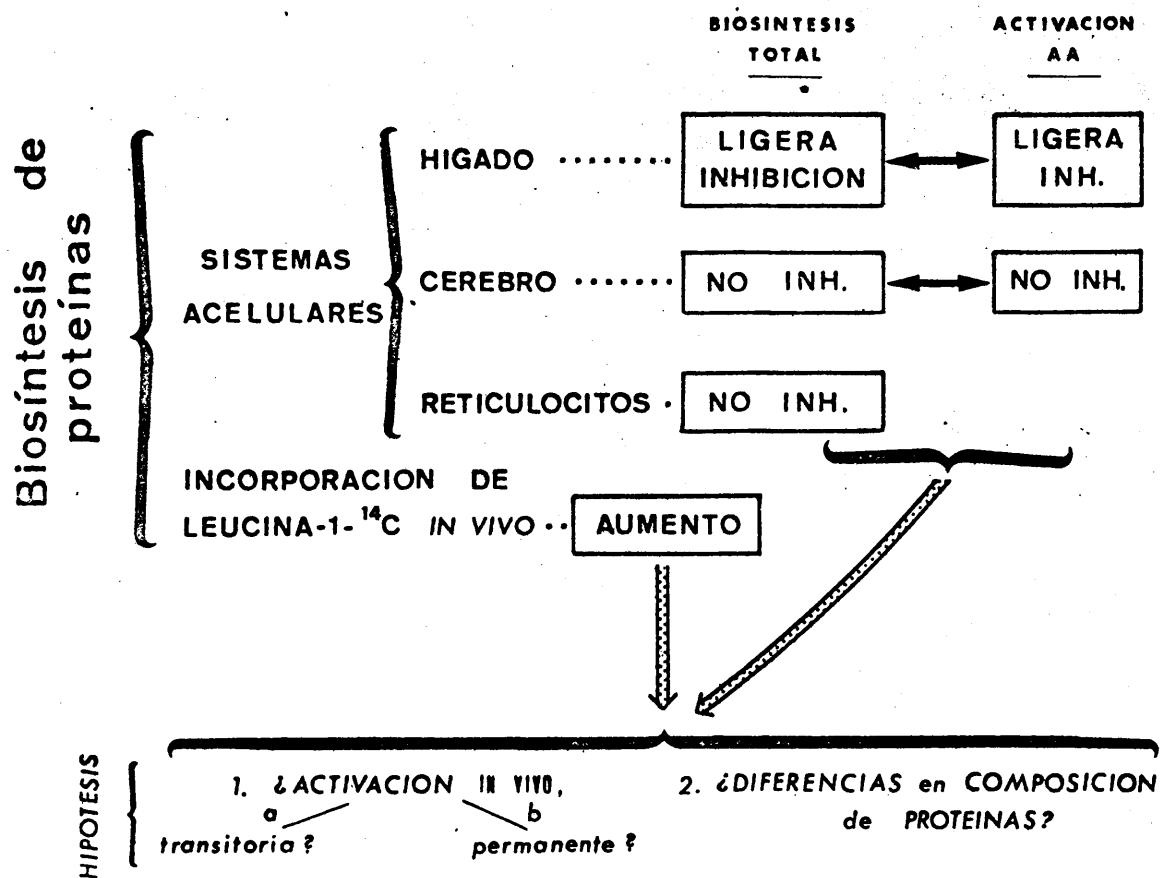
* Aisladas por el método de Siekevitz (482) y contadas a espesor infinito en planchetas de 1 cm².

** Aisladas y contadas por el método de Bennet y col. (469) (véase sección 2.2.2.).

3.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE BIOSINTESIS DE PROTEINAS

En apartados anteriores se han expuesto y comentado los resultados de una investigación sistemática sobre la influencia del amitrol en la biosíntesis de proteínas.

Dos hechos son claros en este momento. Por una parte que el amitrol no puede considerarse como un inhibidor de la síntesis de proteínas, por cuanto únicamente reduce su nivel de modo muy parcial y esto tan sólo



en uno de los sistemas acelulares ensayados. Por otra, que la incorporación de leucina "in vivo" es superior en las ratas tratadas con amitrol. En efecto, en las dos experiencias realizadas las diferencias son significativas (tablas XXII y XXIII). En bazo son del orden del 35%, en hígado oscilan entre el 16% (experiencia 2) y el 35% (experiencia 1), pero en suero llegan al 83%.

Es preciso, pues, compaginar los resultados de las experiencias en sistemas acelulares e "in vivo". El aumento de incorporación de leucina observado en estas últimas puede significar una activación general de la biosíntesis de proteínas pero puede también deberse a la aparición de proteínas más ricas en ese aminoácido como consecuencia del tratamiento con amitrol. En su caso, esa diferencia de composición podría deberse a:

- a) Aparición de proteínas de composición anormal en las ratas tratadas.
- b) Diferencias cuantitativas en la proporción de las distintas proteínas normales.

Para decidir entre las alternativas posibles se plantearon las experiencias que, de modo esquemático, se indican en la figura 14. La valoración de proteínas tenía como objeto decidir si hay o no alteración en sus niveles como consecuencias del tratamiento con amitrol, mientras que su análisis podía indicar la existencia posible de las diferencias de composición antes aludidas.

3.4. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON AMITROL SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS, ACIDOS NUCLEICOS, LIPIDOS Y AMINOACIDOS LIBRES

Todas las experiencias que se detallan en la presente sección suponen el tratamiento previo de grupos de animales con amitrol. Por este motivo se incluye un apartado en el que se da cuenta de las incidencias de los diferentes tratamientos. A continuación se exponen todas las determinaciones que se realizaron con los distintos grupos de animales conforme al esquema de la figura 14.

Para proceder a la valoración de proteínas en hígado, se adoptó el método de Shibko y col. (493), cuyos detalles experimentales se han expuesto en la sección 2.2.3. Según este método se realiza una previa separación selectiva de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, lo que permite valorar simultáneamente, de modo cuantitativo, los tres grupos de constituyentes principales del hígado. El objeto primordial del estudio era, como se ha expuesto en 3.3, la determinación de proteínas, que podía haberse realizado por métodos más inmediatos, pero se juzgó conveniente la obtención de datos acerca del contenido de ácidos nucleicos, cuya participación en los procesos de biosíntesis de proteínas ha sido sobradamente discutida.

3.4.1. Tratamiento de ratas con amitrol.

Se llevaron a cabo tres tratamientos distintos, con diferencias en la edad y sexo de los animales por una parte y en su duración e intensidad por otra. En todos los casos la dosis de amitrol aplicada fue de 1 g/kg. Las diferencias se ponen de manifiesto en la descripción siguiente.

3.4.1.1. *Primera serie de tratamientos*

Se utilizaron cuatro ratas macho cuyo peso oscilaba entre los 185 y los 300 g, con una media de 245 g. A lo largo de 35 días recibieron

10 inyecciones y se registró su peso cada 3 días. En la figura 15 se ha representado el incremento porcentual del mismo frente al tiempo.

Una vez sacrificadas las ratas y antes de proceder a las determinaciones que se detallarán en apartados siguientes se registró el peso del hígado -una vez troceado, lavado con disolución salina y secado con papel de filtro- que se expresa en la tabla XXIV como gramos por 100 g de peso del animal.

TABLA XXIV

PESO DEL HIGADO DE ANIMALES CONTROL Y TRATADOS CON AMITROL.

PRIMERA SERIE

<u>Grupo de animales</u>	<u>Peso del hígado (%)</u>	
	<u>Valores individuales</u>	<u>Media</u>
Control	2.45; 2.50	2.47
Amitrol	2.53; 2.63	2.58

3.4.1.2. Segunda serie de tratamientos

En esta segunda serie las ratas de control tenían un peso que oscilaba entre los 237 y 290 g, con una media de 262 g. Las tratadas con amitrol, con un peso inicial medio idéntico estaban comprendidas entre los 205 y los 295 g. Ambos grupos de ratas recibieron 24 inyecciones durante 105 días.

De la misma manera que en la experiencia anterior se ha representado la variación de su peso, que se aprecia en la figura 16, y el peso del hígado (tabla XXV).

TABLA XXV

PESO DEL HIGADO DE ANIMALES CONTROL Y TRATADOS CON AMITROL

SEGUNDA SERIE

<u>Grupo de animales</u>	<u>Peso del hígado (%)</u>	
	<u>Valores individuales</u>	<u>Media</u>
Control	2.67; 3.24; 3.33;	3.08
Amitrol	2.45; 2.29; 2.20; 2.71;	2.41

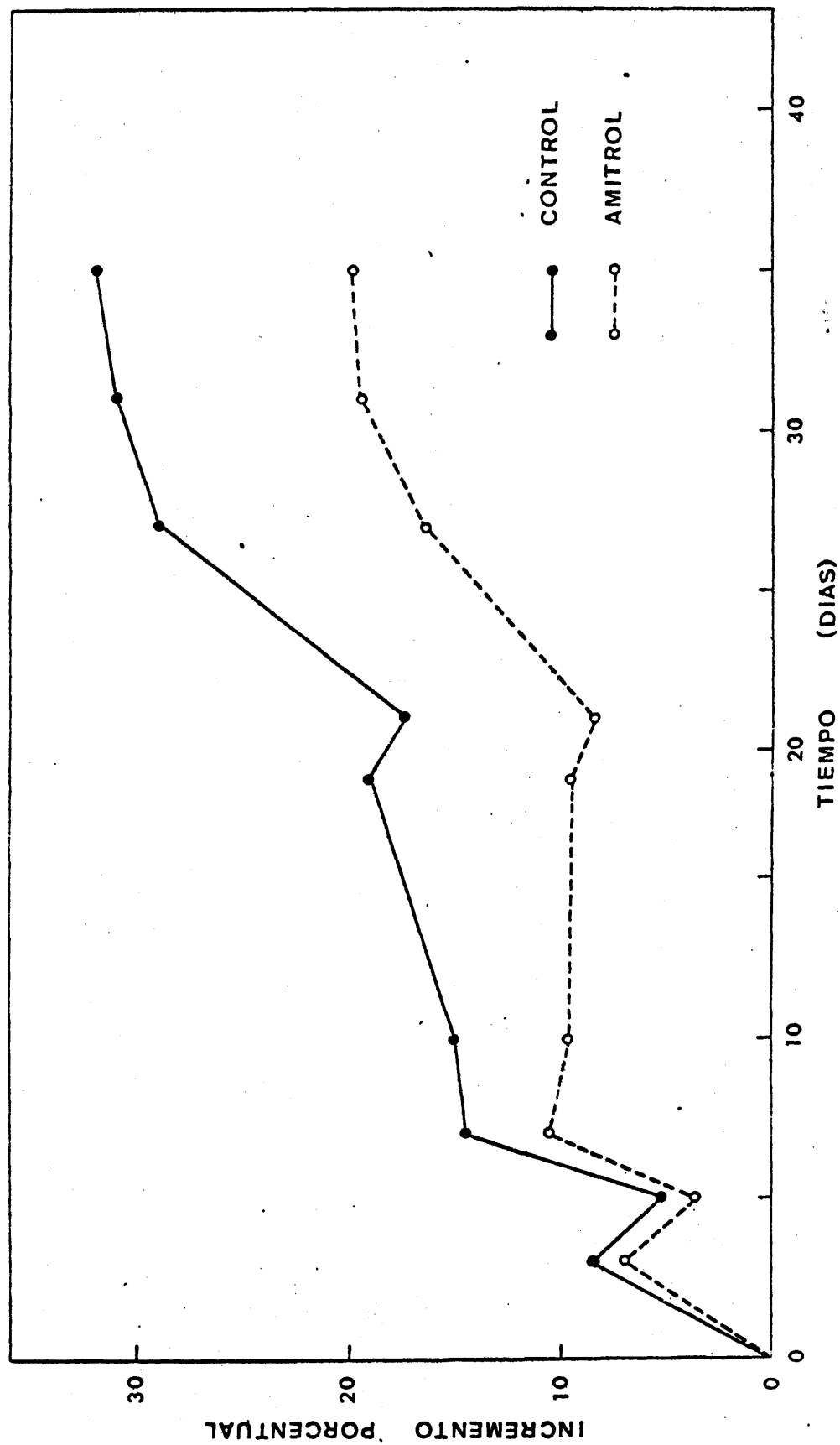


FIGURA 15.- Variación del peso de animales normales y tratados con amitrol. Primera serie.

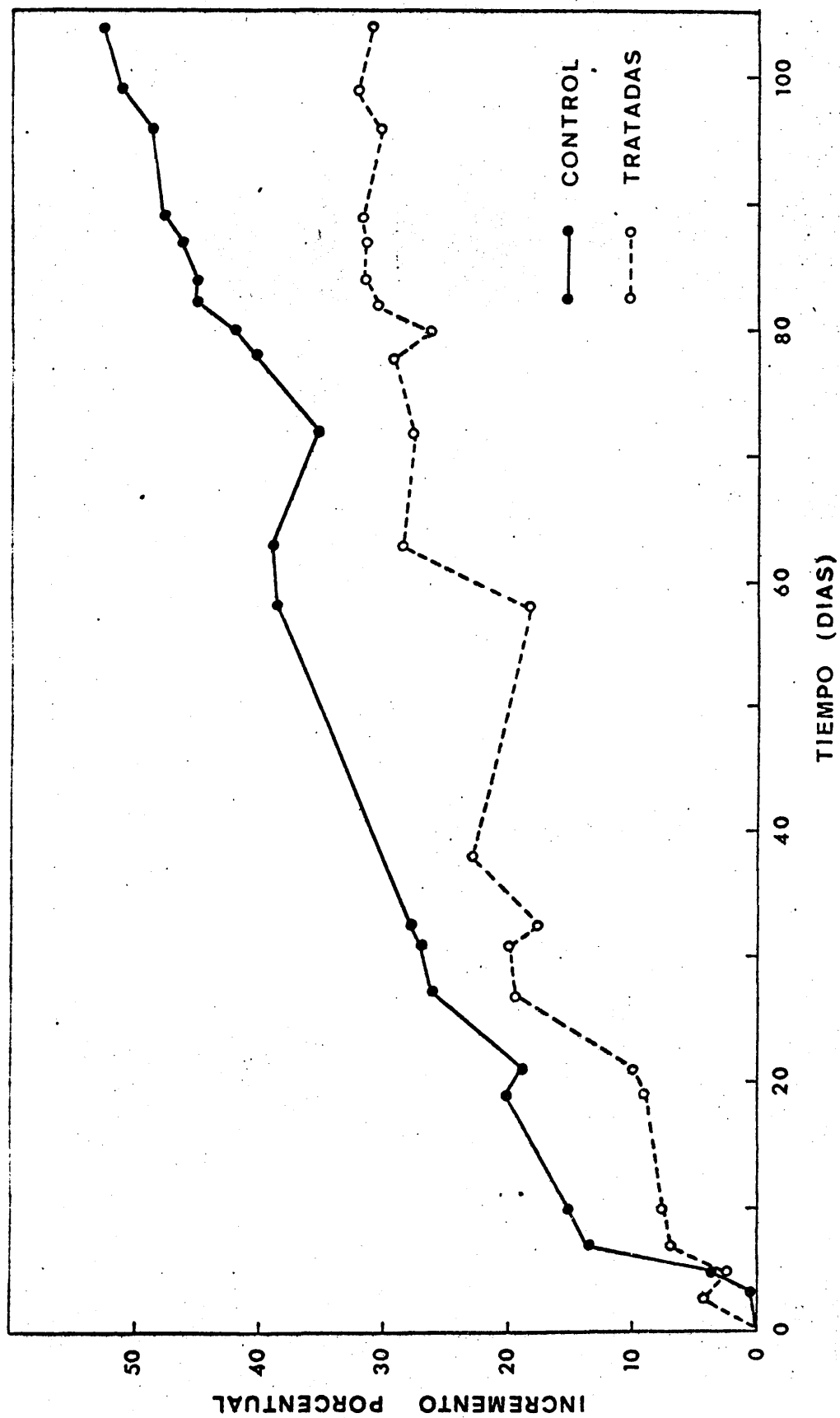


FIGURA 16.- Variación del peso de animales normales y tratados con amitrol.
Segunda serie.

3.4.1.3. Tercera serie de tratamientos.

Se utilizaron 5 ratas de control con pesos comprendidos entre 201 y 233 g con una media de 216 y se sometieron a tratamiento con amitrol (25 inyecciones a lo largo de 55 días) otras 5 cuyos pesos oscilaban entre los 199 y los 227 g (media de 212 g). La variación de peso como consecuencia del tratamiento se ha representado de la forma acostumbrada en la figura 17 y el peso del hígado se indica en la tabla XXVI.

TABLA XXVI

PESO DEL HIGADO DE ANIMALES DE CONTROL Y TRATADOS CON AMITROL
TERCERA SERIE

<u>Grupo de animales</u>	<u>Peso del hígado (%)</u>	
	<u>Valores individuales</u>	<u>Media</u>
Control	2.85; 2.93; 2.72; 2.26; 2.90;	2.73
Amitrol	2.29; 1.96; 2.13; 2.40; 2.29;	2.21

3.4.1.4. Cuarta serie de tratamientos.

Las ratas pertenecientes a esta última serie -hembras de 250 g de peso medio- se sometieron a un tratamiento menos intenso que los dos anteriores, de 7 días de duración, durante los cuales recibieron 5 dosis de amitrol (1 g/kg) por vía parenteral en la forma acostumbrada. Dada la poca duración del tratamiento, no se registró la variación del peso de los animales ni el del hígado.

3.4.1.5. Discusión.

El tratamiento con amitrol lleva implícito en todos los casos un crecimiento menor de los animales. Con ratas jóvenes (véase 3.4.1.3) el peso de las tratadas llega incluso a descender por debajo del inicial, mientras que con ratas de mayor edad sólo se observa, aunque de modo claro, una reducción del crecimiento. En todo caso, esta reducción está de acuerdo con los datos previamente descritos en la bibliografía.

Es también significativa la reducción del tamaño del hígado. Es de destacar el hecho de que esta reducción sólo sea apreciable al cabo de largos periodos de tratamiento, ya que las ratas pertenecientes a la primera serie -semejantes en edad y tamaño a las de la segunda y tratadas simultáneamente con ellas aunque sólo durante 35 días- tenían el hígado

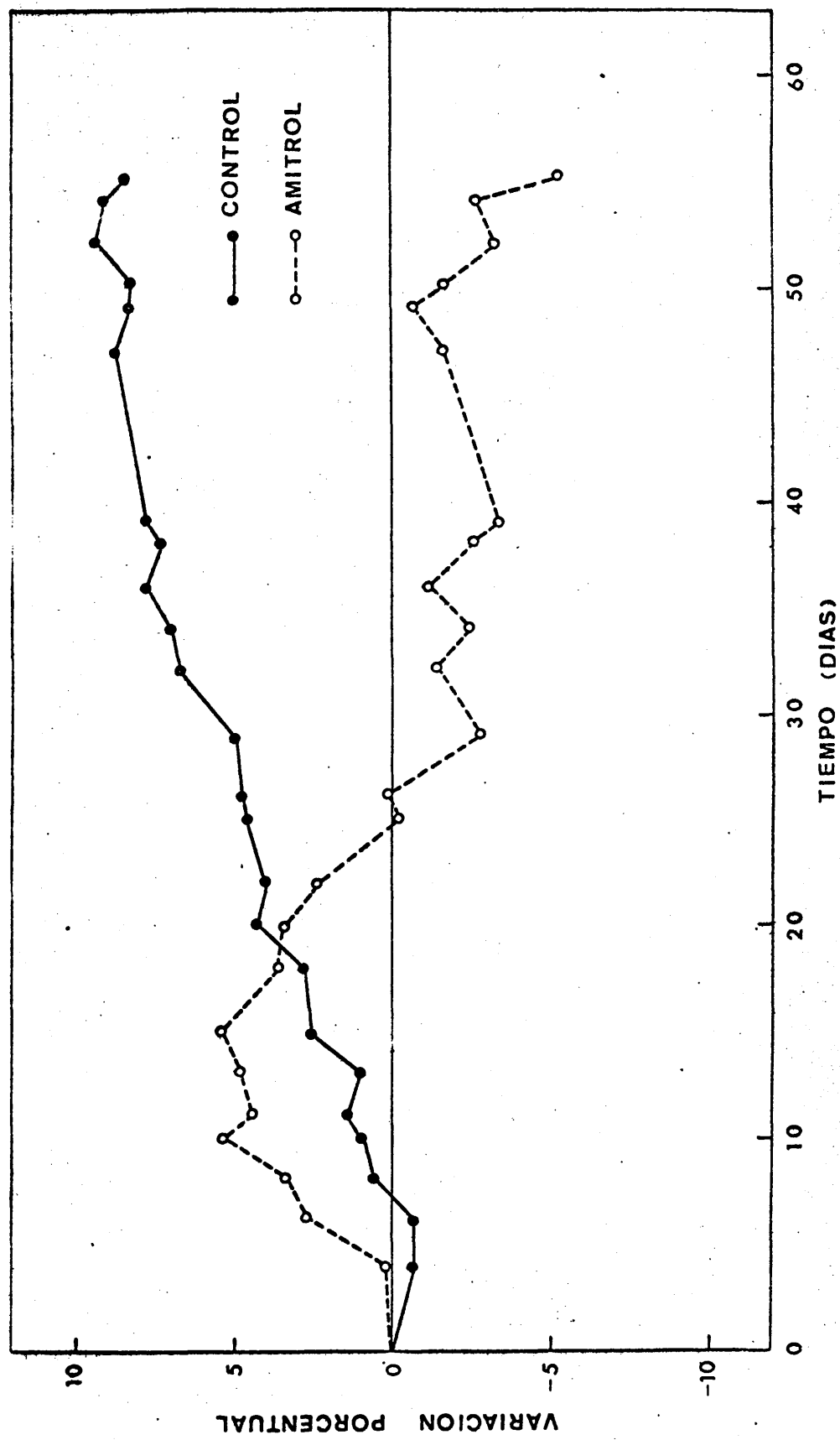


FIGURA 17.- Variación del peso de animales normales y tratados con amitrol. Tercera serie.

ligeramente mayor que el normal. Con los datos expuestos hasta el momento no pueden explicarse ninguna de estas alteraciones, que sugieren la posibilidad de desórdenes metabólicos o lesiones internas producidas por el amitrol. Más adelante se dará cuenta de las investigaciones realizadas para aclarar estos extremos.

De todas formas, los efectos del amitrol son poco pronunciados. Aparte de la pérdida de peso, los animales toleraron bien el tratamiento, lo cual está en concordancia con la escasa toxicidad observada por Durham (95).

3.4.2. Valoración de proteínas.

3.4.2.1. *Resultados experimentales.*

La valoración final de proteínas se realizó, como se ha indicado en la parte experimental, por pesada del precipitado final seco. Dado que es perfectamente posible llegar a obtener ese precipitado de una forma totalmente cuantitativa, la valoración gravimétrica es la más aconsejable. En efecto, la exactitud de un análisis por pesada es superior a la de una determinación colorimétrica y aunque la sensibilidad de ésta última sea superior, la cantidad de proteínas es suficiente para que el error de pesada sea escaso. Además, la precisión obtenida por el método colorimétrico de Lowry depende de la proteína utilizada para construir la curva patrón, toda vez que los residuos de tirosina de las proteínas contribuyen notablemente al desarrollo del complejo coloreado. Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, cabe la posibilidad de que la composición de las proteínas varíe como consecuencia del tratamiento con amitrol, en cuyo caso la utilización de un patrón común en la determinación colorimétrica de proteínas sería causa de un error de extensión no previsible con los datos obtenidos en esta etapa de la investigación.

Con ratas pertenecientes a la segunda serie se realizaron dos valoraciones a partir de muestras distintas de homogeneizado con el fin de asegurar los resultados. Los datos individuales se recogen en la tabla XXVII, expresados como miligramos de proteína por gramo de hígado y como miligramos de proteína hepática por 100 g. de peso total del animal. En la tabla XXVIII se han representado los valores medios de dichos resultados, acompañados de la desviación típica.

Con objeto de comprobar la influencia de un tratamiento con amitrol menos prolongado, se realizó una valoración idéntica con ratas pertene-

cientés a la tercera serie. En la tabla XXIX se recogen los resultados de esta valoración.

TABLA XXVII

CONTENIDO DE PROTEINAS DEL HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL

<u>Valoración</u>	<u>Grupo</u>	<u>Animal n°</u>	<u>Proteínas</u>	
			<u>mg/g hígado</u>	<u>mg/100 g peso total</u>
1 ^a	Control	1	163.6	436.8
		2	151.1	489.5
		3	150.9	502.5
	Amitrol	4	141.2	345.9
		5	150.2	343.9
		6	149.9	329.8
		7	155.1	421.4
2 ^a	Control	1	144.1	385.5
		2	133.3	431.8
		3	132.2	440.2
	Amitrol	4	123.3	302.0
		5	131.6	301.3
		6	125.4	275.8
		7	136.2	369.1

TABLA XXVIII

CONTENIDO DE PROTEINAS DEL HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. VALORES MEDIOS

<u>Valoración</u>	<u>Proteínas (mg/g hígado)</u>		<u>Proteínas hígado (mg/100 g)</u>	
	<u>Control</u>	<u>Amitrol</u>	<u>Control</u>	<u>Amitrol</u>
1 ^a	155.2 ± 5.9	149.1 ± 5.0	476.3	380.3
2 ^a	136.6 ± 5.3	129.1 ± 5.1	419.2	312.0

TABLA XXIX

CONTENIDO DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. TERCERA SERIE

Grupo	Animal n°	Valores individuales		Valores medios	
		mg/g hígado	mg/100 g	mg/g hígado	mg/100 g
Control	1	138.8	395.5		
	2	142.9	418.8		
	3	132.9	361.6	139.4 ± 5.8	379.9
	4	148.5	335.7		
	5	133.9	388.2		
Amitrol	6	133.2	305.0		
	7	118.3	231.8	129.5 ± 8.0	283.4
	8	136.9	328.6		

3.4.2.2. *Discusión.*

En todos los casos investigados el contenido medio de proteínas, expresado como miligramos por gramo de tejido fresco, es ligeramente inferior en las ratas tratadas con amitrol. La dispersión de los resultados hace, no obstante, que en algunos datos individuales no se aprecie esta disminución, pero puede concluirse su existencia dado el sistemático descenso de los valores medios de proteínas en las ratas tratadas.

Dada la reducción del tamaño del hígado en ambas series de animales (tablas XXV y XXVI), es obvio que al expresar el contenido de proteínas como miligramos de proteína hepática por 100 g de peso del animal, la disminución provocada por el amitrol se haga más patente.

Todos estos resultados parecen apuntar en la dirección de que el amitrol no activa la biosíntesis de proteínas "in vivo", pero antes de emitir conclusiones definitivas se analizarán los resultados de las demás valoraciones realizadas.

3.4.3. Valoración de RNA

3.4.3.1. *Resultados experimentales.*

Se valoró el contenido de RNA de hígado de animales pertenecientes a las series segunda y tercera. Como en el caso de las proteínas se realizaron dos valoraciones de RNA de la segunda serie en muestras distin-

tas de homogeneizado.

Antes de proceder a la valoración de los oligorribonucleotidos resultantes de la hidrólisis alcalina (fracción S-1, véase 2.2.3.3) se procedió a la estimación aproximada de la contaminación de esta fracción por parte de proteínas. Para ello se determinó la absorbancia de todas las muestras a 260 y 280 nm y se calculó a partir de estos valores la concentración de proteína. En todos los casos fue lo suficientemente pequeña para permitir la valoración directa del RNA a partir de la absorbancia medida a 260 nm. Los resultados de dicha valoración se han recogido en las tablas XXX, XXXI y XXXII, expresados de un modo semejante al del apartado anterior.

3.4.3.2. *Discusión.*

Los resultados obtenidos en la valoración de RNA son en todos los casos relativamente bajos si se comparan con los 10 mg en que Campbell y Kosterlitz (517) cifran el contenido de RNA por gramo de hígado de rata. Sin embargo, estos datos dependen en gran medida de la dieta a que están sometidos los animales. Según los mismos autores la cantidad de RNA desciende a 8.2 mg/g en animales alimentados con dietas desproteinizadas. Este valor es más próximo a los obtenidos en la presente investigación y hay que tener en cuenta para cualquier comparación que los animales se mantuvieron en ayunas desde 24 horas antes de su muerte.

El contenido de RNA apenas disminuye como consecuencia del tratamiento con amitrol en la segunda serie. Es de destacar que el descenso observado en los valores medios en la segunda valoración, se debe casi exclusivamente al bajo contenido de RNA del hígado del animal n° 7, que no fue determinado en la primera valoración.

Sin embargo, un tratamiento de menor duración como el de la tercera serie (tabla XXXII) sí tiene una clara influencia en el contenido de RNA. En todos los casos -por razón ya apuntada- las diferencias son más notables al expresar los resultados como miligramos de RNA hepático por 100 g de peso total del animal.

TABLA XXX

CONTENIDO DE RNA DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL

SEGUNDA SERIE

<u>Valoración</u>	<u>Grupo</u>	<u>Animal n°</u>	<u>RNA, valores individuales</u>	
			<u>mg/g hígado</u>	<u>mg/100 g peso total</u>
1 ^a	Control	1	4.26	11.37
		2	4.04	13.19
		3	3.58	11.09
	Amitrol	4	3.64	8.96
		5	4.46	10.21
		6	3.98	8.76
2 ^a	Control	1	5.28	14.10
		2	5.13	16.62
		3	4.59	15.28
	Amitrol	4	4.37	10.70
		5	4.95	11.33
		6	3.95	8.69
		7	3.01	13.58

TABLA XXXI

CONTENIDO DE RNA DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL

SEGUNDA SERIE. VALORES MEDIOS

<u>Valoración</u>	<u>RNA (mg/g hígado)</u>		<u>RNA de hígado (mg/100 g)</u>	
	<u>Control</u>	<u>Amitrol</u>	<u>Control</u>	<u>Amitrol</u>
1 ^a	3.96 ± 0.28	4.02 ± 0.36	11.85	9.29
2 ^a	5.00 ± 0.30	4.07 ± 0.71	15.33	11.07

TABLA XXXII

CONTENIDO DE RNA DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
TERCERA SERIE

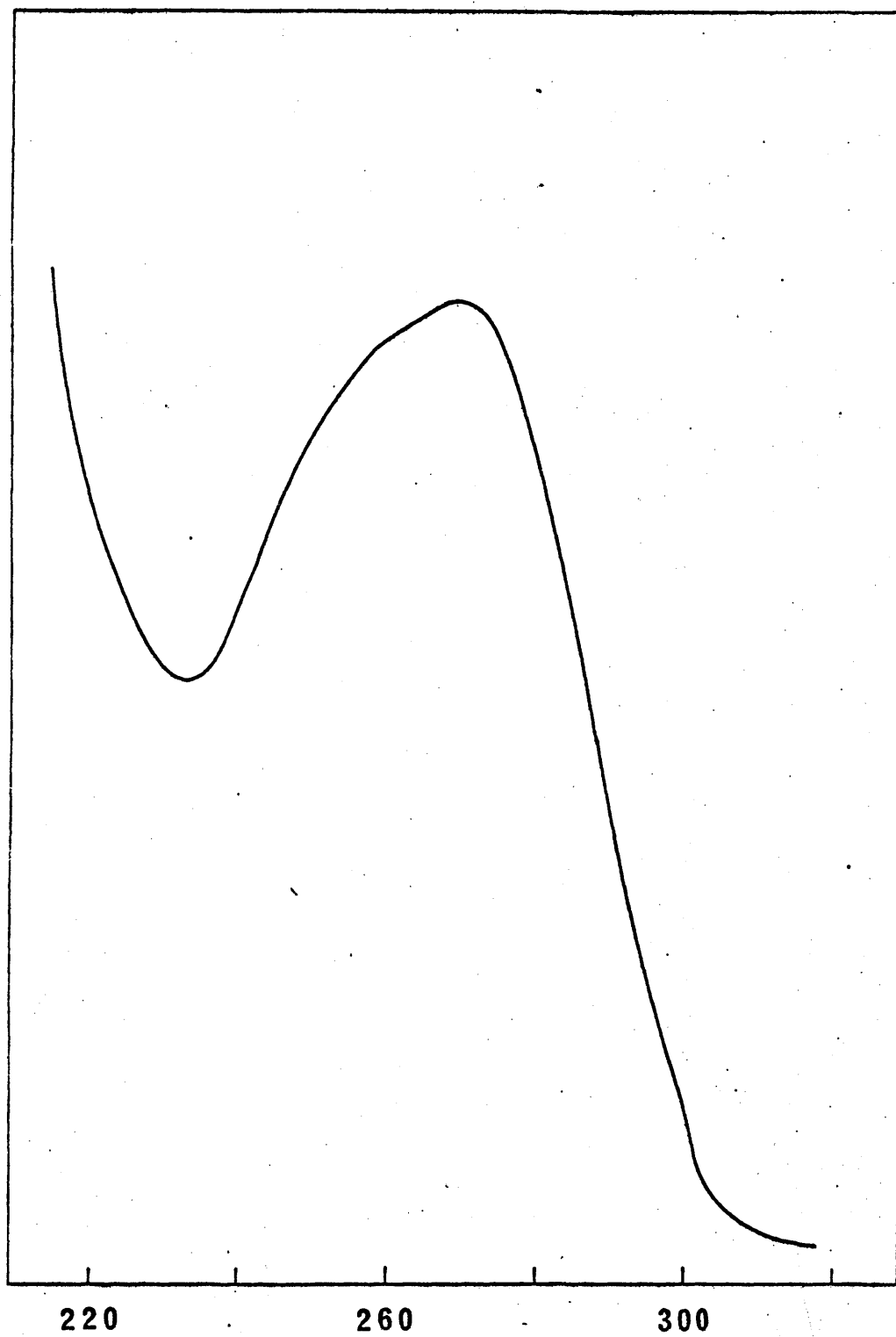
Grupo	Animal n°	Valores individuales		Valores medios	
		mg/g hígado	mg/100 g p.t.	mg/g hígado	mg/100 g p.t.
Control	1	7.94	22.63	6.59 ± 0.71	18.06
	2	6.38	18.69		
	3	6.57	17.92		
	4	6.16	13.92		
	5	5.91	17.14		
Amitrol	6	5.11	11.70	4.78	10.21
	7	4.45	8.72		

3.4.4.1. Resultados experimentales.

Igual que en el caso del RNA se determinó previamente la contaminación de proteínas en la fracción S-2 que contiene los oligodesoxirribonucleótidos procedentes de la hidrólisis parcial del DNA. En la figura 18 se observa el espectro ultravioleta de una de las muestras. Puede apreciarse a simple vista -y esto constituía un hecho general en todas las muestras- un cierto desplazamiento del máximo hacia los 280 nm, lo que denota la presencia de proteínas o, al menos, de productos de su hidrólisis. La cantidad de ellas era despreciable (inferior a 0.7 mg en el total de la fracción S-2) como se pudo comprobar mediante el método colorimétrico de Lowry, con lo que esta impurificación no afecta los resultados de la valoración de proteínas expuestos anteriormente. Pero sí podría interferir con la determinación espectrofotométrica del DNA, cuya concentración en hígado de rata es notablemente inferior a la de proteínas (517). Por este motivo se optó por valorar la desoxirribosa presente en la fracción S-2 con el reactivo de difenilamina, en cuya reacción no interfieren las proteínas.

El cálculo para obtener la cantidad de DNA a partir de la desoxirribosa se realizó suponiendo una participación equivalente de cada una de las cuatro bases en su composición y aparece expresado en las tablas XXXIII y XXXIV (ratas de la segunda serie) y XXXV (tercera serie).

Abs.



220

260

300

Longitud de onda (nm)

FIGURA 18.- Espectro ultravioleta de una fracción S-3
(Véase 2.2.3.3.).

145
TABLA XXXIII

CONTENIDO DE DNA DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
SEGUNDA SERIE

Valoración	Grupo	Animal n°	DNA, valores individuales	
			mg/g de hígado	mg/100 g peso total
1 ^a	Control	1	3.61	9.64
		2	2.99	9.69
		3	2.38	7.92
	Amitrol	4	3.29	8.06
		5	3.61	12.84
		6	3.83	8.42
2 ^a	Control	1	4.07	10.86
		2	4.24	13.74
		3	3.54	11.79
	Amitrol	4	4.88	11.95
		5	5.59	12.80
		6	4.25	9.35

TABLA XXXIV

CONTENIDO DE DNA DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
SEGUNDA SERIE. VALORES MEDIOS

Valoración	DNA, (mg/g de hígado)		DNA de hígado (mg/100 g)	
	Control	Amitrol	Control	Amitrol
1 ^a	2.99 ± 0.51	3.58 ± 0.22	9.08	9.77
2 ^a	3.95 ± 0,30	4.91 ± 0,54	12.13	11.36

3.4.4.2. *Discusión.*

Campbell y Kosterlitz en el trabajo citado cifran en 2.13 mg/g, el contenido de DNA del hígado normal de rata. Puede verse que los valores obtenidos en la presente investigación son superiores para la segunda serie e inferiores para la tercera. El hecho de que ambos grupos de ra-

tas fueran de la misma estirpe y procedentes del mismo criadero hace sospechar que la divergencia entre las dos series se deban a una acción mayor de la DNA durante las manipulaciones a que se sometieron los preparados de la tercera. Sea como sea, la pequeña dispersión que presentan los resultados pertenecientes a una misma valoración hace que los datos sean perfectamente comparables dentro de cada una de ellas.

TABLA XXXV

CONTENIDO DE DNA DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
TERCERA SERIE.

Grupo	Animal n°	DNA valores individuales		DNA, valores medios	
		mg/g hígado	mg/100 g	mg/g hígado	mg/100 g
Control	1	1.32	3.76	1.36 ± 0.12	3.70
	2	1.52	4.45		
	3	1.21	3.29		
	4	1.48	3.34		
	5	1.27	3.68		
Amitrol	6	1.11	2.54	1.11 ± 0.01	2.49
	7	1.11	2.30		
	8	1.10	2.64		

Cuando el tratamiento con amitrol es largo, la cantidad de DNA aumenta ligeramente como consecuencia del mismo (segunda serie, tablas XXXIII y XXXIV), mientras que exhibe una débil tendencia a la disminución, como consecuencia de tratamientos de duración media (tercera serie, tabla XXXV).

La cantidad de DNA por célula es constante una vez alcanzada la madurez del animal y en ratas normales la proporción es de 11.4 mg por cada 10^6 células (518). En algunas anormalidades patológicas, sin embargo, la cantidad de DNA por gramo de tejido se altera. Así ocurre, por ejemplo, en el hepatoma, en el que el nivel de DNA sube a 5.13 mg por gramo de hígado (519). En general, alteraciones de este tipo pueden significar un aumento de la cantidad de DNA por célula o, lo que es más frecuente,

un aumento del número de células por unidad de masa de tejido.

Los resultados expuestos hasta el momento no son suficientes para una adecuada interpretación de los mismos, que se realizará en la sección 3.4.7, a la luz de nuevos datos experimentales.

3.4.5. Valoración de lípidos

3.4.5.1. *Resultados experimentales.*

Se valoraron lípidos en el hígado de las mismas ratas sobre las que se hicieron las determinaciones anteriores. Los resultados se exponen, en la forma acostumbrada, en las tablas XXXVI, XXXVII y XXXVIII.

TABLA XXXVI

CONTENIDO DE LIPIDOS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
SEGUNDA SERIE

Valoración	Grupo	Animal n°	Lípidos	Valores individuales
			mg/g, de hígado	mg/100 g peso total
1 ^a	Control	1	45.5	121.5
		2	42.2	136.8
		3	39.0	129.8
	Amitrol	5	29.3	67.1
		6	35.3	77.6
		7	31.4	85.0
2 ^a	Control	1	32.6	87.0
		2	31.5	102.1
		3	31.6	105.3
	Amitrol	4	25.6	62.7
		5	25.8	59.1
		6	30.5	67.2
		7	31.8	86.1

TABLA XXXVII

CONTENIDO DE LÍPIDOS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
SEGUNDA SERIE. VALORES MEDIOS

Valoración	<u>Lípidos (mg/g de hígado)</u>		<u>Lípidos de hígado (mg/100 g)</u>	
	Control	Amitrol	Control	Amitrol
1 ^a	42.2 ± 2.6	32.0 ± 2.5	129.4	76.6
2 ^a	31.9 ± 0.5	28.4 ± 2.8	98.1	68.8

TABLA XXXVIII

CONTENIDO DE LÍPIDOS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL
TERCERA SERIE

Grupo	Animal n°	<u>Valores individuales</u>			<u>Valores medios</u>		
		mg/g	híg. mg/100 g	p.t.	mg/g	híg. mg/100 g	p.t.
Control	1	59.2	168.8				
	2	53.3	156.1				
	3	49.9	135.7		53.5 ± 4.5	145.5	
	4	57.7	130.4				
	5	47.3	137.1				
Amitrol	7	42.9	84.1				
	8	45.0	108.1		43.9	96.1	

3.4.5.2. Discusión.

En todos los casos el contenido de lípidos es inferior en las ratas tratadas con amitrol. Las diferencias de estos resultados frente a los de ratas normales son superiores a las encontradas en las valoraciones de proteínas y ácidos nucleicos y concuerdan con el menor crecimiento observado en todas las series de ratas tratadas.

Ya que las ratas se mantuvieron en ayunas 24 horas antes de su muerte, no se valoró glucógeno en hígado. Pero aún careciendo de este dato, la disminución del nivel de lípidos puede explicarse por una interferen

cia del amitrol con la glicolisis, semejante a la descrita en vegetales (55, 56). La formación de aminotriazoliltriosa puede ser causa de una producción restringida de acetil-CoA a partir de hexosas, lo que a su vez, tendería a reducir la lipogénesis. Alternativamente la degradación de lípidos puede ser en estas circunstancias mayor de lo normal, ya que, al afectarse la glicolisis, quedaría concomitantemente alterado el equilibrio energético del animal. Las dos posibilidades apuntadas actuarían en el mismo sentido y pueden dar cuenta del descenso de lípidos observado.

3.4.6. Valoración de aminoácidos libres

Se efectuó de la forma descrita en el apartado 2.2.4, en el hígado de animales pertenecientes a la tercera serie de tratamientos (3.4.1.3). En la tabla XXXIX se han recogido los resultados medios de dicha valoración. Es menester, no obstante, tener en cuenta dos hechos para apreciar exactamente el valor de tales resultados. El primero es consecuencia del distinto coeficiente de extinción que presenta a 570 nm el producto de reacción con ninhidrina de los diferentes aminoácidos (*). Esto hace que al escoger leucina como aminoácido patrón en la valoración, los resultados no estén corregidos por tal diferencia de absorción.

TABLA XXXIX

CONTENIDO TOTAL DE AMINOACIDOS LIBRES DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y
Y TRATADAS CON AMITROL

<u>Grupo de animales</u>	<u>Número de determinaciones</u>	<u>μ moles^(*)/g de tejido fresco</u>
Control	4	36
Amitrol	5	42

(*) Expresados como equivalentes a leucina.

Por otra parte, aunque la ninhidrina sea un reactivo clásico de aminoácidos, existen otras sustancias capaces de dar con ella una coloración semejante. Este segundo hecho conduce a que no todas las sustancias

(*) Con más propiedad debería hablarse del distinto rendimiento con que los aminoácidos dan origen a la N-2'-dicetohidrindenil-diceto-2'-hidrindenimina.

valoradas como aminoácidos lo sean realmente. Quizá, entre ellas, deba destacarse el ión NH_4^+ , normalmente abundante en todas las muestras biológicas.

Por estos dos motivos no podrán tomarse los resultados de la tabla XXXIX como totalmente exactos, mientras no se disponga de un análisis completo de aminoácidos libres. Siguen, sin embargo, conservando por completo su valor indicativo.

3.4.7. Interpretación de conjunto de las valoraciones realizadas

3.4.7.1. Tratamientos de duración media.

La cantidad total de amitrol aplicado a los animales de la segunda serie coincide prácticamente con la administrada a los de la tercera, por lo que la discusión puede hacerse en orden a la duración del tratamiento.

Al finalizar el tratamiento de la tercera serie de animales (55 días) el amitrol provocó el descenso del nivel de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, se centra la discusión de este apartado sobre estos últimos componentes.

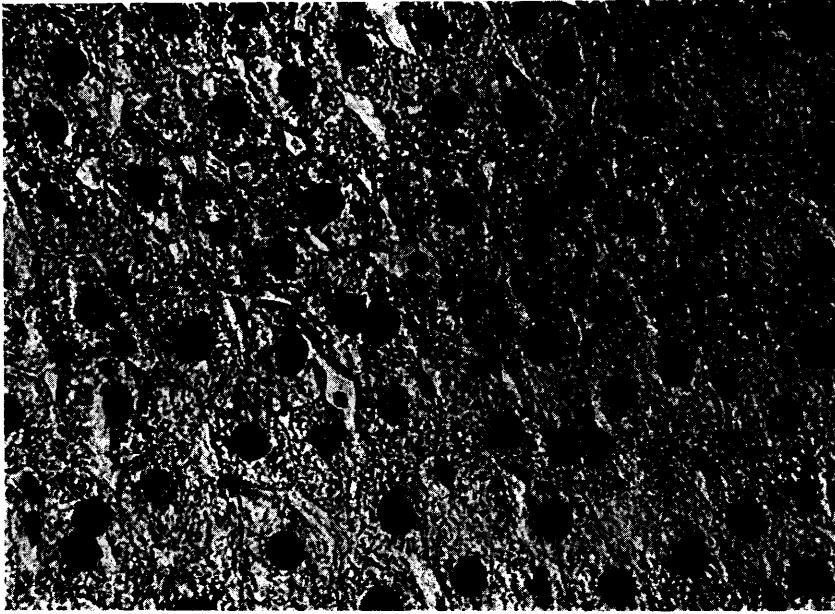
La disminución de DNA puede interpretarse como consecuencia de la interferencia del amitrol con la biosíntesis de bases púricas (83) y con la fosforilación de nucleosidos (91). Estos extremos no han sido descritos hasta la fecha en mamíferos pero, por otra parte y como se ha comentado anteriormente, los resultados de la presente investigación sugieren que el metabolismo de hidratos de carbono se altera en mamíferos de forma paralela a la observada en vegetales. El bloqueo de la posición 6 de la glucosa por parte del amitrol puede así reducir la actividad metabólica del ciclo de las pentosas y permite explicar el menor nivel de DNA sin necesidad de poner en cuestión la inhibición de síntesis de purinas o de fosforilación de nucleosidos.

Desde un punto de vista citológico, la disminución de DNA por unidad de masa de tejido puede traducirse bien en un aumento del tamaño de las células, bien en la pérdida de DNA por célula. Esta última posibilidad, a su vez, puede significar:

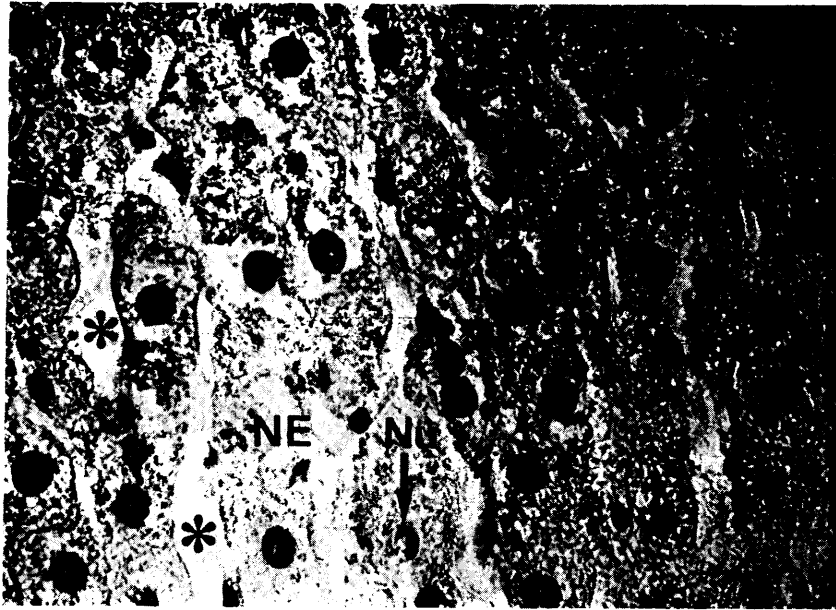
- a) Una pérdida generalizada de DNA celular.
- b) Una pérdida de DNA más acusada en algunas células hepáticas, manteniéndose normal el resto.

El estudio microscópico comparativo del hígado de animales de control y tratados con amitrol, permite desechar la posibilidad de aumento

A



B



LAMINA I

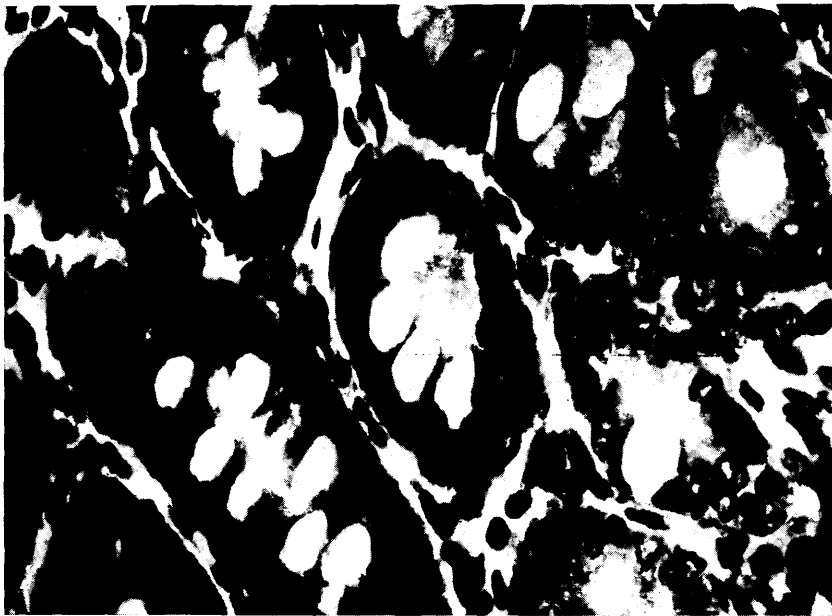
A) Microfotografía de una sección del parénquima hepático de rata normal. Se aprecian perfectamente los núcleos (Nu) y algunos eritrocitos (E) en el interior de vasos.

B) Microfotografía de una sección del parénquima hepático de una rata tratada con amitrol. Se observa una zona de necrosis (NE) relativamente extensa, con núcleos deformados (Nu) o ausencia de ellos. En todo el campo se advierte también disociación de trabéculas (*).

A



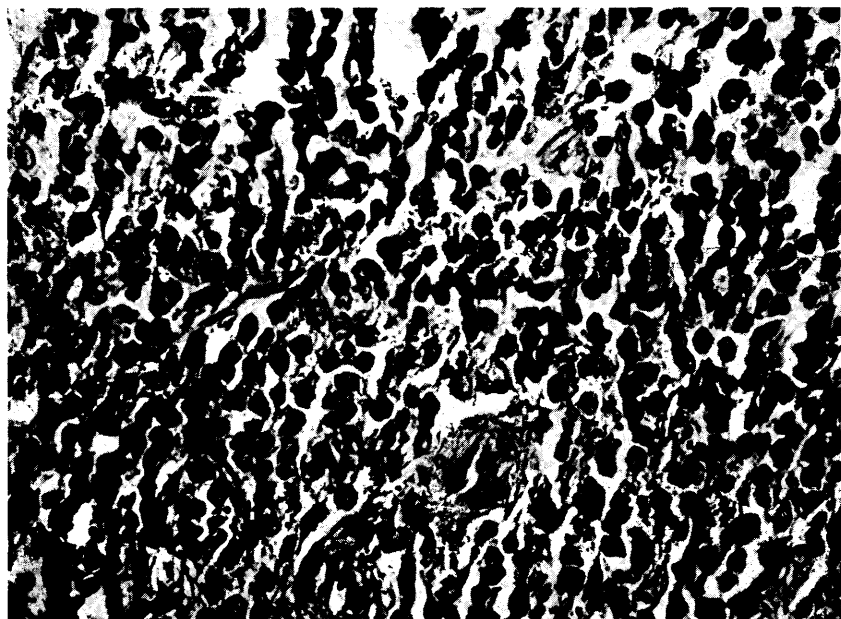
B



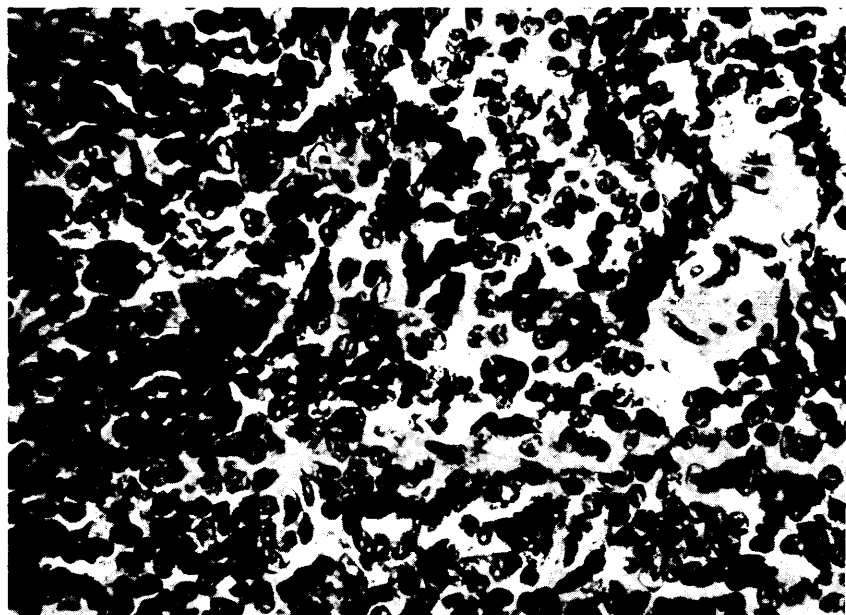
LAMINA II

Cortes longitudinales (A) y transversales (B) de vellosidades intestinales de ratas tratadas con amitrol. No se observan anomalías.

A



B



LAMINA III

Microfotografías de secciones de bazo de ratas normal (A) y tratada con amitol (B). No se aprecian anomalías importantes en esta última.

de tamaño de células (lámina I). En efecto, la aparición de zonas concretas de necrosis en el parénquima hepático de animales tratados en las que se aprecian células con núcleos dañados o ausencia de ellos y disociación de trabéculas (lámina I, B) indica que, en realidad, se cumple la hipótesis b) arriba expresada.

Seguramente la disminución de DNA bastaría para justificar la de RNA y proteínas pero es menester tener en cuenta que el RNA puede disminuir, además, por la carencia de sustratos para su biosíntesis.

Por otra parte, el amitrol reduce la producción de tiroxina (107) y, aunque de origen a cambios hiperplásicos en el tiroides, la carencia parcial de esa hormona hace que las ratas tratadas se comporten fisiológicamente como hipotiroideas. Se ha comentado en la primera parte de esta memoria que el hipotiroidismo reduce el nivel de proteínas hepáticas (426) y esta reducción puede obedecer a la desactivación de la traducción de la transcripción, o de ambas a la vez (427).

Todos los efectos del amitrol estudiados en esta sección se penetran, pues, entre si y conviene resaltar que la disminución del RNA y de proteínas obedece a dos causas paralelas: de un lado la carencia de DNA en zonas concretas del parénquima hepático y, de otro, la acción in directa del amitrol sobre el hígado a través del tiroides.

Puede desecharse la idea de que el bajo nivel de ácidos nucleicos y proteínas sea consecuencia de dificultades de absorción intestinal como ocurre en ciertas intoxicaciones. La estructura de la mucosa intestinal no presenta síntomas de anormalidad. En la lámina II se pueden observar cortes longitudinales (A) y transversales (B) de las vellosidades intestinales que, de ordinario, son sensibles a una acción tóxica directa que impida la absorción normal.

En concordancia con todos estos resultados se encuentran los del análisis de sangre practicado con los animales de la tercera serie. El recuento de células indica una ligera anemia ($6.85 \cdot 10^6$ eritrocitos por μ l de sangre frente al valor normal de $7-8 \cdot 10^6$) y una mayor leucopenia (6.500 leucocitos por μ l frente a los 8.000-10.000 normales en rata). Estas ligeras alteraciones pueden obedecer a deficiencias de síntesis de proteínas ya que no se observan anormalidades en los tejidos hematopoyéticos y hematóliticos, médula ósea y bazo (lámina III), pero la anemia, por su parte, puede también ser efecto del bloqueo metabólico del

hierro por parte del amitrol (véase la primera parte de esta memoria).

3.4.7.2. *Tratamientos de larga duración.*

En las valoraciones realizadas con animales de la segunda serie, resulta llamativo el aumento de DNA como consecuencia del tratamiento con amitrol. Este hecho implica que las causas que hacían disminuir la síntesis de DNA en la primera fase del tratamiento (escasez de sustratos, inhibición de la fosforilación) se han superado, o bien que han comenzado a actuar mecanismos de regulación anormales que dirigen la actividad metabólica de las células hacia una síntesis global más rápida de DNA. No parece probable la primera hipótesis y es la segunda la más plausible. En efecto, aunque la acción más directa del amitrol se ejerce sobre el tiroides, está descrita la aparición de alteraciones neoplásicas en hígado al cabo de largos periodos de administración (104). Una de las manifestaciones químicas del hepatoma es, como se ha comentado (519), el aumento del nivel de DNA, por lo que, aunque al cabo de los 105 días de tratamiento de los animales de la segunda serie no se apreciaron alteraciones macroscópicas ni metástasis en hígado, es lógico pensar que el aumento observado en la cantidad de DNA sea una primera manifestación bioquímica de la alteración neoplásica.

El hecho de que el aumento de DNA no tenga un reflejo totalmente paralelo en los niveles de RNA y proteínas es también explicable a base de la reducción de transcripción y traducción que provoca la carencia de tiroxina.

3.5. ANALISIS DE PROTEINAS

3.5.1. Composición de proteínas

3.5.1.1. *Composición de proteínas hepáticas.*

La primera determinación se realizó con proteínas -aisladas de hígado por el método de Siekevitz (482)- de ratas pertenecientes a la primera serie de tratamientos.

Antes de proceder al análisis automático de aminoácidos en el hidrolizado, se efectuaron cromatografías previas del mismo en capa fina de celulosa en la forma descrita en 2.2.5. Los hidrolizados procedentes de ratas tratadas con amitrol se cromatografiaron por duplicado y se reveló una placa con ninhidrina y la otra con el reactivo "H" (7). No se observó en esta última mancha alguna, lo cual pone de manifiesto la no

incorporación de amitrolil-alanina a proteínas hepáticas.

Los resultados del análisis automático de aminoácidos en los hidrolizados obtenidos de ratas de control y tratadas (dos animales en cada grupo) aparecen en la tabla XL, expresados como moles de cada aminoácido por 100 moles del total del hidrolizado. No se han efectuado correcciones por pérdidas durante la hidrólisis.

TABLA XL

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. PRIMERA SERIE.

Aminoácido	Grupo de animales			
	Control		Amitrol	
asptasn	9.76	8.78	9.07	9.29
thr	5.21	5.11	5.11	5.18
ser	5.67	5.33	5.52	5.50
glu+gln	10.40	10.47	10.73	10.58
pro	5.75	6.05	5.00	5.16
gly	7.44	7.67	7.83	7.93
ala	7.76	8.16	8.29	8.44
1/2cys	0.77	0.87	0.86	0.83
val	7.07	6.83	7.24	7.39
met	1.58	1.24	1.70	1.52
ile	5.32	5.47	5.44	6.03
leu	9.33	9.97	9.48	10.74
tyr	2.30	2.41	2.26	2.11
phe	5.21	4.67	4.15	4.66
lys	8.43	8.98	8.86	7.19
his	2.79	2.87	3.49	3.92
arg	5.20	5.12	4.93	3.52

Puede observarse que las proteínas de ratas normales y tratadas exhiben una composición muy semejante, con variaciones poco importantes en ambos grupos. Quizá las más significativas sean las que se observan en prolina, que desciende ligeramente en los animales tratados, e histidina,

más abundante en éstos que en los de control. Aunque no sea concluyente por si mismo, este último hecho apunta la posibilidad de que el amitrol no altere en mamíferos la disponibilidad de histidina cuya síntesis -como se ha comentado en la parte teórica- es capaz de bloquear en microorganismos.

De todas formas, los resultados no pueden tomarse como definitivos sin un detallado análisis estadístico, por lo que se procedió al análisis de proteínas de un grupo más numeroso de animales pertenecientes a la segunda serie de tratamientos (véase 3.4.1.2). En las tablas XLI y XLII se recoge la composición de las proteínas hepáticas aisladas en esta nueva experiencia.

TABLA XLI

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. SEGUNDA SERIE

Aminoácido	Control. Animal n°			Amitrol. Animal n°			
	1	2	3	4	5	6	7
asptasn	9.45	9.82	10.01	9.49	9.48	9.59	9.59
thr	5.60	5.26	5.59	5.47	4.64	4.93	5.61
ser	6.08	6.56	6.85	6.30	6.16	6.46	6.72
glu+gln	11.15	10.83	10.19	10.71	10.00	11.76	10.88
pro	5.79	5.64	6.13	5.92	5.85	5.37	5.90
gly	7.83	7.45	7.84	8.12	7.28	7.83	7.83
ala	8.56	8.37	8.92	8.96	8.90	8.95	8.56
1/2cys	1.11	0.86	1.17	1.21	1.00	1.01	1.06
val	5.68	5.39	5.50	5.31	5.38	5.17	5.53
met	1.52	1.73	1.54	1.44	1.75	1.38	1.63
ile	4.51	4.31	3.97	4.02	4.28	4.13	4.13
leu	10.08	10.03	9.74	9.65	10.07	12.00	9.62
tyr	2.73	2.86	2.70	2.43	2.63	2.13	2.44
phe	4.57	4.60	4.33	4.25	4.69	3.46	3.56
lys	8.71	9.02	8.66	8.28	9.87	9.83	8.99
his	1.98	2.07	2.43	2.36	2.93	1.81	2.11
arg	4.64	5.21	4.42	6.07	5.07	4.21	4.82

TABLA XLII

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON
AMITROL. VALORES MEDIOS DE LA SEGUNDA SERIE

Aminoácido	Grupo de animales	
	Control	Amitrol
asptasn	9.75 ± 0.23	9.54 ± 0.05
thr	5.48 ± 0.15	5.16 ± 0.39
ser	6.49 ± 0.32	6.41 ± 0.21
glu+gln	10.71 ± 0.40	10.84 ± 0.63
pro	5.85 ± 0.20	5.76 ± 0.23
gly	7.70 ± 0.18	7.76 ± 0.30
ala	8.61 ± 0.23	8.84 ± 0.17
1/2cys	1.05 ± 0.13	1.07 ± 0.08
val	5.52 ± 0.12	5.35 ± 0.13
met	1.59 ± 0.09	1.55 ± 0.47
ile	4.26 ± 0.22	4.14 ± 0.09
leu	9.94 ± 0.15	10.33 ± 0.61
tyr	2.76 ± 0.07	2.41 ± 0.18
phe	4.49 ± 0.12	4.24 ± 0.48
lys	8.79 ± 0.16	9.24 ± 0.66
his	2.16 ± 0.19	2.30 ± 0.41
arg	4.75 ± 0.32	5.04 ± 0.67

Estos resultados indican pequeñas variaciones que, en la mayor parte de los casos, no son significativas estadísticamente. Casi todas las variaciones de los valores medios son del mismo signo que las observadas en la primera serie, aunque, como consecuencia del estudio más completo realizado con la segunda, pueden descartarse algunas de las diferencias que se manifestaban en la primera serie.

Lo mismo puede decirse respecto al análisis de las proteínas hepáticas de los animales de la tercera serie, cuyos resultados -individuales y medios respectivamente- se recogen en las tablas XLIII y XLIV. En esta última experiencia se han realizado, además, correcciones sobre

TABLA XLIII

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL. TERCERA SERIE.

Aminoácido	Animales de control (+)										Animales tratados (+)							
	1	1'	2	2'	3	4	4	4'	4'	4'	6	6'	7	7'	8	8'	8'	8'
asptasn	9.38	9.51	9.20	8.90	9.17	9.11	9.64	9.47	9.12	9.12	9.87	10.07	9.31	9.51	8.95	9.17		
thr	4.82	5.05	4.72	4.88	5.69	5.83	5.01	4.88	5.19	5.19	4.96	4.85	4.97	4.99	4.82	4.70		
ser	4.50	5.16	4.86	4.54	4.62	5.35	5.27	4.82	4.98	4.98	4.96	4.67	4.82	5.12	4.67	5.17		
glu+gln	10.84	11.39	11.13	10.64	10.60	11.03	11.27	11.11	10.87	10.87	11.48	11.12	10.60	11.25	10.58	11.10		
pro	6.39	4.85	7.22	6.05	7.34	5.56	5.55	5.72	5.95	5.95	5.09	6.88	5.68	5.61	5.37	7.38		
gly	6.99	7.91	7.73	7.41	7.31	7.50	7.89	7.62	7.63	7.63	7.66	7.55	7.47	7.78	7.29	7.65		
ala	7.05	8.59	8.53	8.00	7.89	7.68	8.34	8.17	7.93	7.93	8.39	8.35	7.90	8.17	7.89	8.32		
val	6.89	7.77	7.70	7.33	7.26	6.86	7.46	7.46	7.19	7.19	7.39	6.58	6.92	7.35	6.98	7.43		
met	1.98	1.58	1.56	1.60	1.54	1.65	1.69	1.85	1.72	1.72	1.86	1.77	2.09	1.78	1.64	1.72		
ile	5.84	5.87	5.82	5.87	5.42	5.93	5.91	5.92	6.10	6.10	5.76	5.86	5.88	5.94	5.62	5.73		
leu	11.29	10.78	10.97	10.82	10.05	10.37	10.07	10.69	10.97	10.97	10.55	10.84	10.83	11.04	10.56	10.27		
tyr	2.04	1.67	1.64	1.45	1.57	1.92	1.86	1.59	1.77	1.77	1.66	1.69	2.55	2.04	1.80	1.78		
phe	4.75	4.50	4.51	4.71	4.04	4.15	4.67	4.53	4.71	4.71	4.43	4.44	4.57	4.66	4.46	4.47		
lys	9.09	8.08	7.73	8.81	9.67	8.84	8.16	8.83	8.28	8.28	8.25	8.40	8.56	7.57	9.60	8.33		
his	3.06	2.79	2.60	4.10	3.03	3.12	2.55	2.67	2.73	2.73	2.80	2.70	2.90	2.60	4.95	2.50		
arg	5.06	4.49	4.08	4.88	4.78	5.08	4.67	4.65	4.84	4.84	4.69	4.14	4.95	4.60	4.84	4.28		

(+) Cuando el número del animal aparece con apóstrofe (') significa que se han realizado análisis sobre hidrolizados distintos de la misma proteína. Cuando aparece duplicado, los análisis se han realizado sobre el mismo hidrolizado.

TABLA XLIV

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON
AMITROL. VALORES MEDIOS DE LA TERCERA SERIE

Aminoácido	Grupo de animales	
	Control	Amitrol
asp+asn	9.28 \pm 0.22	9.48 \pm 0.39
thr	5.12 \pm 0.37	4.88 \pm 0.10
ser	4.90 \pm 0.30	4.90 \pm 0.20
glu+gln	10.99 \pm 0.25	11.02 \pm 0.33
pro	6.07 \pm 0.76	6.00 \pm 0.84
gly	7.55 \pm 0.28	7.57 \pm 0.16
ala	8.02 \pm 0.45	8.16 \pm 0.21
val	7.32 \pm 0.30	7.11 \pm 0.31
met	1.69 \pm 0.14	1.81 \pm 0.14
ile	5.85 \pm 0.17	5.80 \pm 0.10
leu	10.67 \pm 0.40	10.68 \pm 0.25
tyr	1.72 \pm 0.18	1.92 \pm 0.30
phe	4.51 \pm 0.34	4.50 \pm 0.10
lys	8.61 \pm 0.56	8.45 \pm 0.60
his	2.96 \pm 0.45	3.07 \pm 0.85
arg	4.73 \pm 0.29	4.58 \pm 0.29

el contenido de hidroxiaminoácidos para subsanar las pérdidas de hidrólisis. Para ello se determinó la proporción de serina y treonina en hidrolizados de una misma proteína obtenidos en igualdad de condiciones pero con tiempos de hidrólisis variables. En la tabla XLV se pueden apreciar estas variaciones. A partir de los datos experimentales consignados en ella se calculó el porcentaje real de dichos aminoácidos extrapolando a tiempo cero por el método de los mínimos cuadrados. Con los valores obtenidos por extrapolación se corrigieron los datos de la tabla XLIII y los nuevos porcentajes se recogen en la tabla XLVI y sus medias con las correspondientes desviaciones típicas, en la XLVII.

TABLA XLV

PERDIDAS DE SERINA Y TREONINA EN EL TRANSCURSO DE LA HIDROLISIS

<u>Tiempo de hidrólisis (hr)</u>	<u>Porcentaje de hidroxiaminoácidos</u>	
	<u>Serina</u>	<u>Treonina</u>
18	4.86	4.72
24	4.45	4.60
36	4.27	4.46
43	3.99	4.41
0 (extrapolado)	5.34	4.94

TABLA XLVII

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. VALORES MEDIOS DE LA TERCERA SERIE CORREGIDOS POR
PERDIDAS DE HIDROLISIS

<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo de animales</u>	
	<u>Control</u>	<u>Amitrol</u>
asp+asn	9.21 ± 0.22	9.41 ± 0.38
thr	5.32 ± 0.38	5.07 ± 0.11
ser	5.37 ± 0.32	5.38 ± 0.22
glu+gln	10.90 ± 0.25	10.94 ± 0.33
pro	6.02 ± 0.76	5.96 ± 0.83
gly	7.50 ± 0.27	7.51 ± 0.15
ala	7.96 ± 0.44	8.11 ± 0.23
val	7.27 ± 0.30	7.05 ± 0.30
met	1.67 ± 0.14	1.80 ± 0.14
ile	5.81 ± 0.17	5.76 ± 0.10
leu	10.59 ± 0.40	10.61 ± 0.25
tyr	1.71 ± 0.18	1.91 ± 0.30
phe	4.47 ± 0.24	4.47 ± 0.08
lys	8.55 ± 0.56	8.39 ± 0.60
his	2.94 ± 0.44	3.05 ± 0.87
arg	4.69 ± 0.29	4.55 ± 0.27

TABLA XLVI

COMPOSICION DE PROTEINAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL. TERCERA SERIE.
VALORES INDIVIDUALES CORREGIDOS POR PERDIDAS DE HIDROLISIS.

Aminoácido	Animales de control (+)										Animales tratados (+)					
	1	1'	2	2'	3	4	4	4'	4'	6	6'	7	7'	8	8'	
asptasn	9.32	9.44	9.13	8.84	9.10	9.04	9.56	9.40	9.05	9.79	10.00	9.24	9.44	9.89	9.10	
thr	5.02	5.25	4.90	5.07	5.92	6.05	5.20	5.07	5.39	5.15	5.04	5.16	5.18	5.01	4.88	
ser	4.94	5.66	5.33	4.98	5.06	5.86	5.77	5.29	5.46	5.44	5.12	5.29	5.62	5.12	5.67	
glutgln	10.77	11.30	11.05	10.56	10.52	10.94	11.18	11.03	10.79	11.39	11.04	10.52	11.16	10.50	11.02	
pro	6.35	4.81	7.17	6.01	7.29	5.51	5.51	5.68	5.90	5.05	6.83	5.64	5.57	5.33	7.32	
gly	6.94	7.85	7.67	7.36	7.26	7.44	7'83	7.56	7.57	7.60	7.50	7.41	7.72	7.24	7.59	
ala	7.00	8.52	8.47	7.94	7.83	7.62	8.27	8.11	7.87	8.33	8.29	7.84	8.11	7.80	8.26	
val	6.84	7.71	7.64	7.28	7.21	6.80	7.40	7.41	7.14	7.33	6.53	6.87	7.29	6.93	7'37	
met	1.97	1.57	1.55	1.59	1.53	1.64	1.68	1.84	1.71	1.85	1.76	2.07	1.77	1.63	1.71	
ile	5.80	5.82	5.78	5.83	5.38	5.88	5.86	5.88	6.05	5.72	5.82	5.84	5.89	5.58	5.69	
leu	11.21	10.70	10.89	10.74	9.98	10.29	9.99	10.61	10.89	10.47	10.77	10.75	10.95	10.49	10.19	
tyr	2.03	1.66	1.63	1.44	1.56	1.90	1.84	1.58	1.76	1.65	1.68	2.53	2.02	1.79	1.77	
phe	4.72	4.47	4.48	4.68	4.01	4.12	4.63	4.50	4.67	4.40	4.41	4.54	4.62	4.43	4.44	
lys	9.03	8.02	7.67	8.75	9.60	8.77	8.10	8.77	8.22	8.19	8.34	8.50	7.51	9.53	8.27	
his	3.04	2.77	2.58	4.07	3.01	3.09	2.53	2.65	2.71	2.78	2.68	2.88	2.58	4.91	2.48	
arg	5.03	4.46	4.05	4.84	4.74	5.04	4.63	4.62	4.80	4.65	4.11	4.91	4.56	4.80	4.25	

(+) Véase nota al pie de la tabla XLV.

3.5.1.2. Composición de proteínas de suero.

Las proteínas de suero son más sensibles que las de hígado al tratamiento con amitrol. Esto se advierte al examinar las tablas XLVIII y IL, en las que se han recogido -en la forma acostumbrada- la composición de las proteínas aisladas de suero de animales normales y tratados con amitrol.

TABLA XLVIII

COMPOSICION DE PROTEINAS DE SUERO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. SEGUNDA SERIE.

Aminoácido	Control. Animal n°			Amitrol. Animal n°			
	1	2	3	4	5	6	7
asp+asn	10.61	10.56	9.90	10.20	10.16	10.18	10.35
thr	6.67	6.87	7.03	6.64	6.50	7.24	6.83
ser	6.40	7.19	7.76	7.52	6.44	6.95	7.18
glu+gln	13.53	13.01	11.93	12.56	12.66	12.62	13.10
pro	4.99	5.18	5.99	6.26	6.58	6.20	4.68
gly	5.12	5.17	5.52	4.87	4.90	4.88	4.90
ala	8.16	8.23	8.06	8.58	7.46	7.93	7.61
1/2cys	2.21	2.20	1.99	1.35	2.13	2.03	2.22
val	5.84	6.07	6.73	5.89	5.78	5.71	5.80
met	0.97	0.98	1.03	0.94	0.98	0.96	1.05
ile	2.72	2.64	3.17	2.70	2.94	2.79	2.90
leu	10.06	9.88	9.18	9.84	9.99	10.01	10.55
tyr	2.69	2.91	3.18	2.11	2.57	2.10	3.21
phe	3.93	3.76	3.78	2.96	3.63	3.94	3.66
lys	10.14	9.86	9.59	11.39	11.05	10.84	10.04
his	2.66	2.28	2.22	2.92	2.83	2.50	2.48
arg	3.28	3.21	2.95	3.67	3.40	3.12	3.42

Sin que existan tampoco grandes diferencias, éstas son más significativas que en el caso de hígado. Destacan las encontradas en el porcentaje de glicocola, ya que la pequeña dispersión de los resultados permi

te ponerlas de manifiesto con suma claridad. Son también significativas las diferencias halladas en valina y lisina y destacables, aunque menos, las que se parecían en arginina o histidina.

TABLA II

COMPOSICION DE PROTEINAS DE SUERO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL. SEGUNDA SERIE. VALORES MEDIOS.

Aminoácido	Grupo de animales	
	Control	Amitrol
asptasn	10.35 ± 0.32	10.22 ± 0.07
thr	6.85 ± 0.15	6.80 ± 0.28
ser	7.11 ± 0.56	7.02 ± 0.39
glu+gln	12.81 ± 0.67	12.73 ± 0.21
pro	5.38 ± 0.43	5.93 ± 0.74
gly	5.26 ± 0.18	4.89 ± 0.01
ala	8.14 ± 0.07	7.79 ± 0.28
1/2cys	2.13 ± 0.10	1.93 ± 0.34
val	6.21 ± 0.38	5.79 ± 0.06
met	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.04
ile	2.84 ± 0.23	2.83 ± 0.09
leu	9.70 ± 0.38	10.10 ± 0.27
tyr	2.92 ± 0.20	2.50 ± 0.45
phe	3.82 ± 0.08	3.55 ± 0.36
lys	9.85 ± 0.22	10.83 ± 0.50
his	2.38 ± 0.19	2.68 ± 0.20
arg	3.14 ± 0.14	3.40 ± 0.19

Consideradas en su conjunto las proteínas de suero de ratas tratadas con amitrol resultan ser más básicas que las normales. La relación de aminoácidos básicos frente a ácidos alcanza en ellas un valor medio de 0.74, mientras que esta relación es sólo de 0.66 en las normales. La proporción de ácidos en las proteínas originales sólo se determinó de modo semicuantitativo, por lo que los resultados no se han incluido en

la tabla correspondiente, pero indican una cantidad de ellas equivalente en ambos grupos de animales, por lo que conserva su validez la afirmación anterior sobre la desigualdad en la proporción de proteínas básicas.

3.5.2. Análisis electroforético de proteínas de suero

La existencia de alteraciones en la composición de proteínas de suero sugiere la posibilidad de que haya diferencias en la proporción de sus distintas clases. La electroforesis es una técnica adecuada para detectar tales diferencias, por lo que se han analizado de esta manera sueros de animales normales y tratados con amitrol. En la figura 19 se han recogido los trazados densitométricos correspondientes a dos electroforesis de suero de animales de control y tratados con amitrol. Pueden observarse a simple vista diferencias en la proporción relativa de globulinas que, de modo más completo y cuantitativo se recogen en la tabla L.

TABLA L

COMPOSICION DEL SUERO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL

Grupo de proteínas	Proporción relativa (%)	
	Control	Amitrol
Albúmina	34.3 ± 0.3	35.2 ± 1.4
α ₁ -globulinas	18.1 ± 1.3	17.1 ± 0.7
α ₂ -globulinas	10.3 ± 0.8	6.6 ± 1.8
β-globulinas	22.5 ± 0.3	16.6 ± 1.1
γ-globulinas	11.4 ± 0.1	24.7 ± 2.2

La electroforesis en gel de poliacrilamida, que proporciona un análisis de resolución mucho mayor, permite también en este caso examinar con más detalles las zonas en las que se aprecia variación en las proteínas de suero (figura 20). No obstante, el estudio de la región de las γ-globulinas es difícil mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, ya que las inmunoglobulinas de coeficientes de sedimentación 7 S, por sus características de microheterogeneidad, presentan una dis

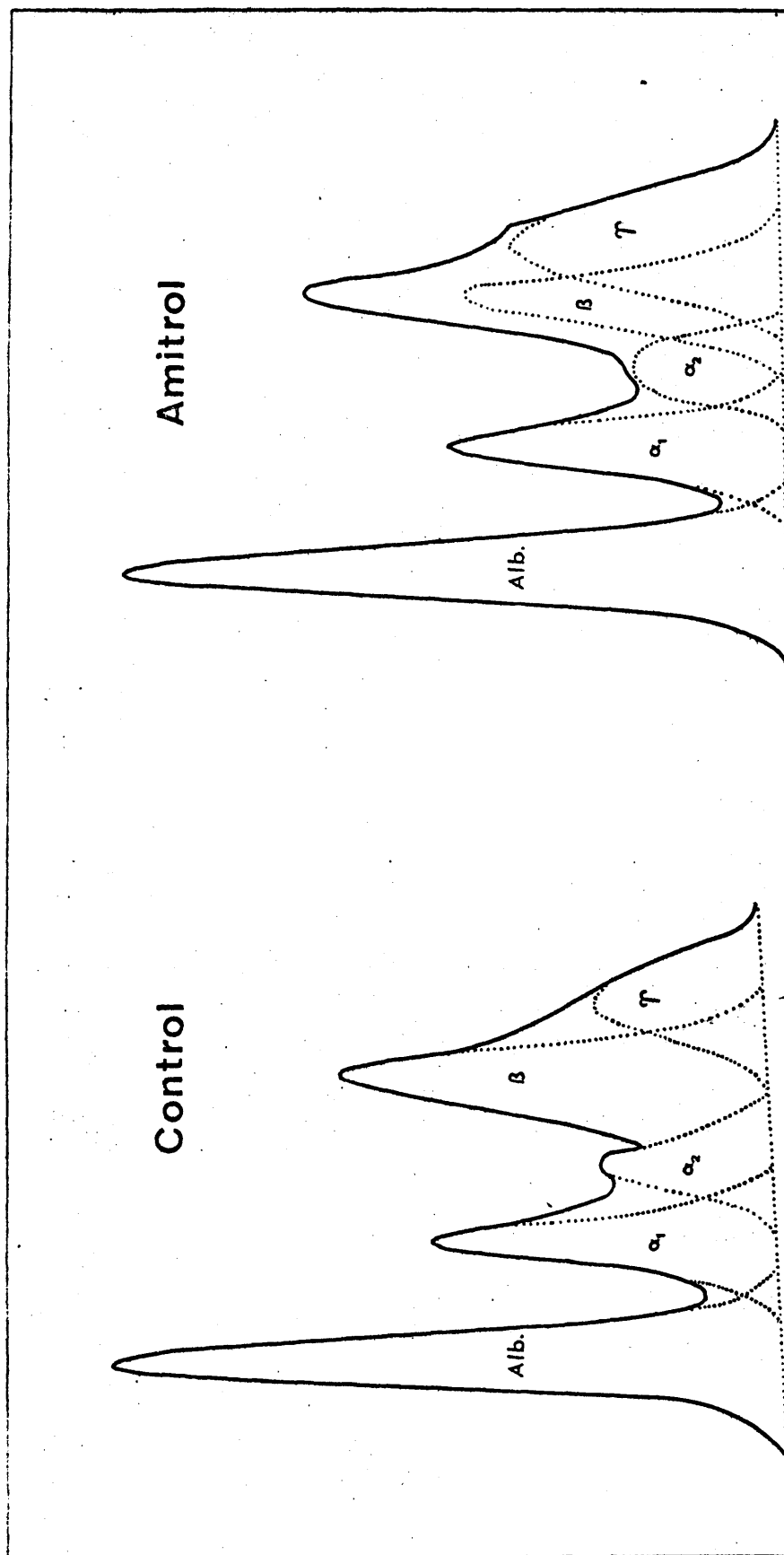


FIGURA 19.- Electroforesis en gel de acetato de celulosa de suero de ratas normales y tratadas con amitrol.

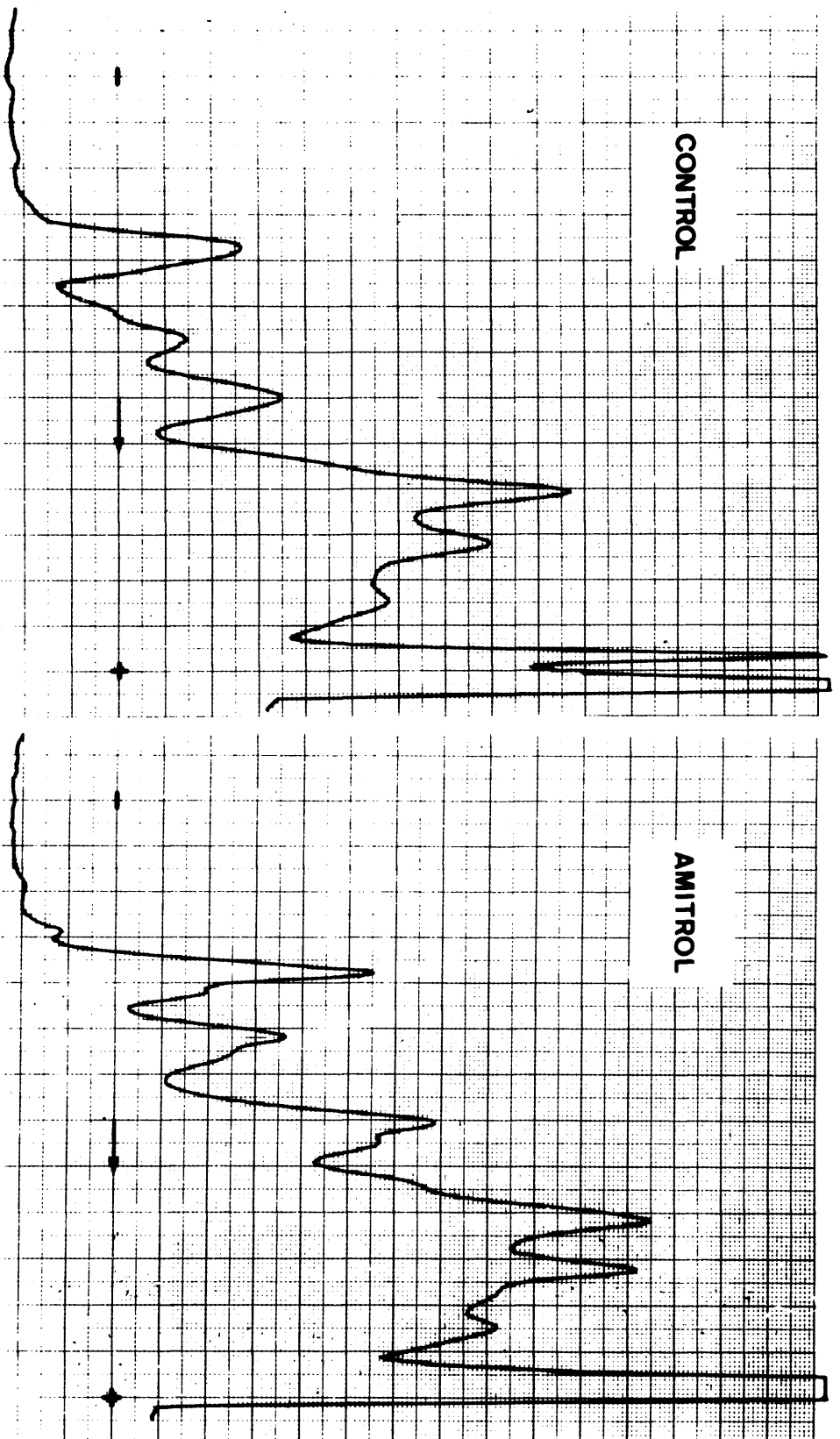


Figura 20

tribución difusa en el gel y las de 19 S no son capaces de penetrar en el mismo.

3.5.3. Discusión

Del estudio de las tablas XL, XLII y XLVII puede concluirse que el tratamiento con amitrol sólo produce pequeñas alteraciones en la composición de proteínas hepáticas que, en la mayor parte de los casos, no son significativas. Por el contrario, si existen diferencias claras en las proteínas de suero (tabla IL). McWhorter y Hilton (85) han descrito las variaciones que provoca el amitrol en la composición de proteínas de maiz, variaciones que, en muchos casos, pueden justificarse por la diferente disponibilidad de aminoácidos libres como sustratos para la biosíntesis de proteínas. Aunque más adelante se vuelva sobre este hecho y se comparen los resultados obtenidos en la presente investigación con los del trabajo de McWhorter y Hilton, es conveniente dejar ahora constancia de que no se da un paralelismo total entre las diferencias provocadas por el amitrol en las proteínas vegetales estudiadas por dichos autores y las observadas en las de suero de rata en la presente investigación. Es lógico pensar, por consiguiente, que las causas que motivan las diferencias de composición de proteínas sean distintas en vegetales y en mamíferos, aunque en ambos casos se de una disminución de la cantidad total de proteínas después de largos tratamientos con amitrol.

En el caso presente, después de observar el aumento que provoca el amitrol en el nivel de γ -globulinas es lógico pensar que las diferencias de composición de las proteínas totales de suero se deba a la variación en la proporción relativa de globulinas. Esta suposición está apoyada por el incremento observado en la relación entre aminoácidos básicos y ácidos, ya que las inmunoglobulinas son, entre las demás proteínas de suero, las de punto isoeléctrico más elevado.

Por otra parte, las inmunoglobulinas son las únicas proteínas de suero que no se sintetizan en hígado, hecho que permite encajar todos los resultados obtenidos en la siguiente hipótesis: el amitrol, mediante una acción indirecta a través del tiroides, reduce, después de largos periodos de tratamiento, el nivel de proteínas sintetizadas en dicho tejido, al menos en un nivel apreciable mediante análisis de aminoácidos. Con independencia de estos hechos, y como es frecuente en casos

de intoxicación, el nivel de inmunoglobulinas aumenta en suero y justifica las diferencias que se apreciaban en la composición total de sus proteínas.

El aumento en la incorporación de leucina observado en las experiencias "in vivo" no puede justificarse como originado por la síntesis de proteínas más ricas en este aminoácido (véase apartado 3.3) ya que su proporción es muy semejante en proteínas -tanto de hígado como de suero- de animales normales y tratados con amitrol. Estas consideraciones y los resultados de las tablas XXII y XXIII indican que durante los primeros días del tratamiento con amitrol tiene lugar una síntesis más activa de proteínas, lo que está de acuerdo con el aumento del tamaño del hígado observado como consecuencia de tratamientos de corta duración (tabla XXIV).

Anteriormente se ha comentado que la reducción del nivel de biosíntesis de proteínas en vegetales tratados con amitrol está relacionada con la disponibilidad de aminoácidos. Con el fin de completar también de esta manera el estudio de la influencia del amitrol sobre la biosíntesis de proteínas en mamíferos se procedió, como se describirá a continuación, al análisis de aminoácidos libres de los que, a través de las experiencias expuestas hasta el momento, sólo se ha determinado su cantidad total.

3.6. ANALISIS DE AMINOACIDOS LIBRES

3.6.1. Aminoácidos libres en hígado

El método utilizado para la preparación de muestras es el más adecuado para realizar sobre las mismas porciones de tejido, todas las valoraciones y análisis descritos anteriormente. Aunque no sea el más adecuado para la obtención de aminoácidos libres, la posibilidad, arriba apuntada, de realizar todas las determinaciones sobre una misma muestra compensa los inconvenientes que presenta la extracción de aminoácidos libres con ácido perclórico. El empleo de este ácido como precipitante de proteínas entraña la pérdida parcial de ácido glutámico, anidas y, sobre todo, de triptófano. Pero, salvando este último caso, las pérdidas que podrían revestir cierta importancia para estudios absolutos, no la tienen en un tratamiento comparativo, por lo que los resultados obtenidos son totalmente válidos con tal fin.

En las tablas LI y LII se han recogido los resultados del análisis automático de aminoácidos libres en hígado. Lógicamente las sumas de los niveles individuales de los aminoácidos no corresponden exactamente con los resultados obtenidos en la valoración de aminoácidos libres totales (tabla XXXIX) por cuanto allí se expresaron como μ moles equivalentes a leucina y en las tablas LI y LII aparecen los μ moles reales de cada aminoácido.

TABLA LI

AMINOACIDOS LIBRES EN EL HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON
AMITROL. A) AMINOACIDOS PROTEICOS

Aminoácido	Intervalo (*) (‡)	Media (*)	Animales tratados Valores individuales (*)		
asp	1.34 - 1.56	1.45	1.83	2.08	1.51
thr	0.78 - 1.36	1.14	1.21	0.98	0.71
ser	1.08 - 2.48	1.93	2.25	1.55	1.29
asn+gln	0.05 - 0.23	0.17	0.30	0.25	tr
pro	0.57 - 0.68	0.63	0.70	0.67	0.67
glu	3.65 - 6.52	4.67	5.95	7.26	6.87
gly	1.31 - 4.55	3.02	5.67	4.51	2.47
ala	1.90 - 5.89	4.04	2.89	3.18	2.47
val	0.43 - 0.81	0.59	0.78	0.73	
ile	0.33 - 0.54	0.40	0.47	0.43	
leu	0.49 - 1.05	0.74	0.89	0.76	
tyr	0.23 - 0.55	0.39	0.39	0.35	
phe	0.21 - 0.58	0.43	0.36	0.38	
lys	0.21 - 1.34	0.62	0.97	0.89	
his	0.06 - 0.53	0.32	0.33	0.38	

(*) μ moles por gramo de hígado fresco.

(‡) Valores individuales extremos en los animales investigados.

TABLA LII

AMINOACIDOS LIBRES EN EL HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON
AMITROL. B) AMINOACIDOS NO PROTEICOS.

Aminoácido o compuesto de reacción positiva con ninhidrina	Animales de control			Animales tratados		
	Intervalo (*)	(\dagger)	Media (*)	Valores individuales (*)		
Fosfoserina	0.42	-	1.10	0.73	0.40 ^c	0.16
Glicerilfosforil etanolamina	0.72	-	1.09	0.96	0.46	0.17
Fosfoetanolamina	2.57	-	4.68	3.31	2.69	6.27
Taurina	3.32	-	6.81	5.36	12.44	11.23
Urea	8.48	-	11.87	10.07	10.05	16.25
Sulfóxidos de metionina			-		0.25	0.37
Citrulina			tr		tr	tr
Ac. α -amino-butírico	0.03	-	0.14	0.09	-	-
Glucosamina	0.05	-	0.35	0.16	0.19	-
β -alanina	0.08	-	0.45	0.24	0.16	0.11
Ac. β -amino-isobutírico			tr		tr	-
Ac. γ -amino-isobutírico			tr		1.60	-
Ornitina	0.05	-	0.72	0.29	0.78	0.44
Etanolamina	0.04	-	0.97	0.34	0.60	0.79
NH ₄ ⁺	5.81	-	9.90	7.62	9.69	10.48
Otros no identificados	0.08	-	4.14		1.25	tr

(*) μ moles por gramo de hígado fresco.

(\dagger) Valores individuales extremos en los animales investigados.

En general puede decirse que el tratamiento con amitrol afecta más a los aminoácidos no proteicos que a los proteicos. Las diferencias más importantes se encuentran en taurina y también es notable la

presencia de sulfóxidos de metionina en las ratas tratadas frente a su total ausencia en las normales. Estos resultados sugieren una acción del amitrol. Los niveles de fosfoserina, glicerofosfoetanolamina y ácidos aspártico y glutámico también se alteran apreciablemente.

La histidina, por el contrario, no disminuye en absoluto como consecuencia del tratamiento, lo que indica que no se inhibe su síntesis en mamíferos, al contrario de lo que ocurre en microorganismos. Esta conclusión ya se había apuntado de modo provisional al estudiar la composición de las proteínas de hígado y suero pero ahora se tienen ya datos suficientes para elevarla a definitiva y relacionarla de nuevo con aquellos datos. Si el amitrol no altera el metabolismo de histidina y el nivel de este aminoácido en los animales tratados es normal, no existe restricción alguna para su incorporación a proteínas. Así se justifica también el que no se haya detectado amitrolilalanina en hidrolizados de proteínas puesto que si el nivel de histidina es normal, no es probable que se utilicen sus análogos para la biosíntesis de proteínas.

El análisis de aminoácidos permite también establecer diferencias entre el comportamiento de los mamíferos y vegetales frente al tratamiento con amitrol. En vegetales la formación de amitrolilalanina que, como se ha comentado, constituye una forma de anular la toxicidad del amitrol, tiene lugar a expensas de glicocola y serina, aminoácidos que -en su estado libre- desaparecen prácticamente de los tejidos afectados. No ocurre así en mamíferos, ya que, como puede apreciarse en la tabla LI el nivel de serina se mantiene dentro de límites normales y el de glicocola puede incluso llegar a ser superior al de las ratas de control. Consecuencia de este alto nivel de glicocola es que el cociente entre su concentración y la de serina -el aminoácido más relacionado metabólicamente con ella- sea mayor en las ratas tratadas que en las normales (tabla LIII).

TABLA LIII

RELACION MOLAR GLICOCOLA/SERINA EN HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS
CON AMITROL

Grupo de animales	Relación molar gly/ser	
	Intervalo (*)	Media
Control	1.21 - 2.03	1.51
Amitrol	1.91 - 2.91	2.45

(*) Valores individuales extremos en los animales investigados.

3.6.2. Aminoácidos libres en suero

El análisis de aminoácidos libres en suero revela también diferencias entre las ratas de control y las tratadas con amitrol. Sin embargo, el valor de este análisis es limitado, ya que el contenido de aminoácidos libres en suero depende en gran medida del estado nutricional del animal.

Así pues, entre todas las diferencias observadas sólo se recogen en la presente memoria las encontradas en la relación molar glicocola/serina por ser particularmente significativas. En las ratas normales, esta relación oscila entre 1.29 y 2.47, mientras que en las tratadas tiene un valor (reproducibile en dos determinaciones) de 0.67.

La alteración de esta relación es de signo contrario a la observada en hígado (tabla LIII) pero, en todo caso, pone de manifiesto la posible existencia de modificaciones, inducidas por el amitrol, en el metabolismo de glicocola.

3.6.3. Discusión

En los casos estudiados el tratamiento con amitrol provoca cambios cuali y cuantitativos en los aminoácidos libres, tanto de hígado como de suero. Pero esas variaciones no pueden justificar los efectos del amitrol sobre la biosíntesis de proteínas "in vivo". La disponibilidad de aminoácidos no se anula -al contrario de lo que ocurre en vegetales- salvo en el caso de un aminoácido no proteico; el ácido α -aminobutírico.

Así pues, los resultados últimamente expuestos no modifican la hipótesis que, para explicar la influencia del amitrol sobre la biosíntesis de proteínas, se estableció en el apartado 3.5.2.

Se ha llamado anteriormente la atención sobre el hecho de que el amitrol no provoca la disminución de los niveles de glicocola y serina. Por el contrario, la relación entre las concentraciones de estos dos aminoácidos se altera sensiblemente como consecuencia del tratamiento. Esta alteración es de signo opuesto en hígado y suero y permite sugerir variaciones en el metabolismo -biosíntesis o utilización- de estos aminoácidos.

Estas consideraciones movieron a completar la investigación descrita hasta el momento con el estudio de dos nuevas cuestiones. Por una parte, la interconversión de glicocola y serina, cuya alteración en los animales tratados conduciría -al menos potencialmente- a los cambios observados en la concentración relativa de esos aminoácidos. Por otra, la eliminación y metabolismo del amitrol, ya que al no agotar la disponibilidad de glicocola y serina debe darse en dichos procesos alguna circunstancia que diferencie el comportamiento de mamíferos y vegetales frente al tratamiento con amitrol.

De esta manera, como se indica esquemáticamente en la figura 21, las investigaciones expuestas hasta el momento desembocaron en el estudio de las influencias del amitrol sobre el equilibrio glicocola-serina y en el de la eliminación y transformaciones de dicha sustancia en mamíferos.

3.7. INFLUENCIA DEL AMITROL SOBRE EL METABOLISMO DE GLICOCOLA

3.7.1. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales

3.7.1.1. *Incubaciones con homogeneizados de hígado de cobaya.*

En las experiencias realizadas con homogeneizados totales se observó, en general, un nivel de síntesis de serina a partir de glicocola es caso aunque apreciable.

En la figura 22 se observa el cromatograma correspondiente a una de las muestras de control de la experiencia 1 (véase la descripción de esta experiencia en 2.3.1.1) acompañado de dos registros automáticos de radiactividad. En el cromatograma se aprecia claramente la mancha correspondiente a glicocola y otra, de R_f menor, situada en la zona del ácido

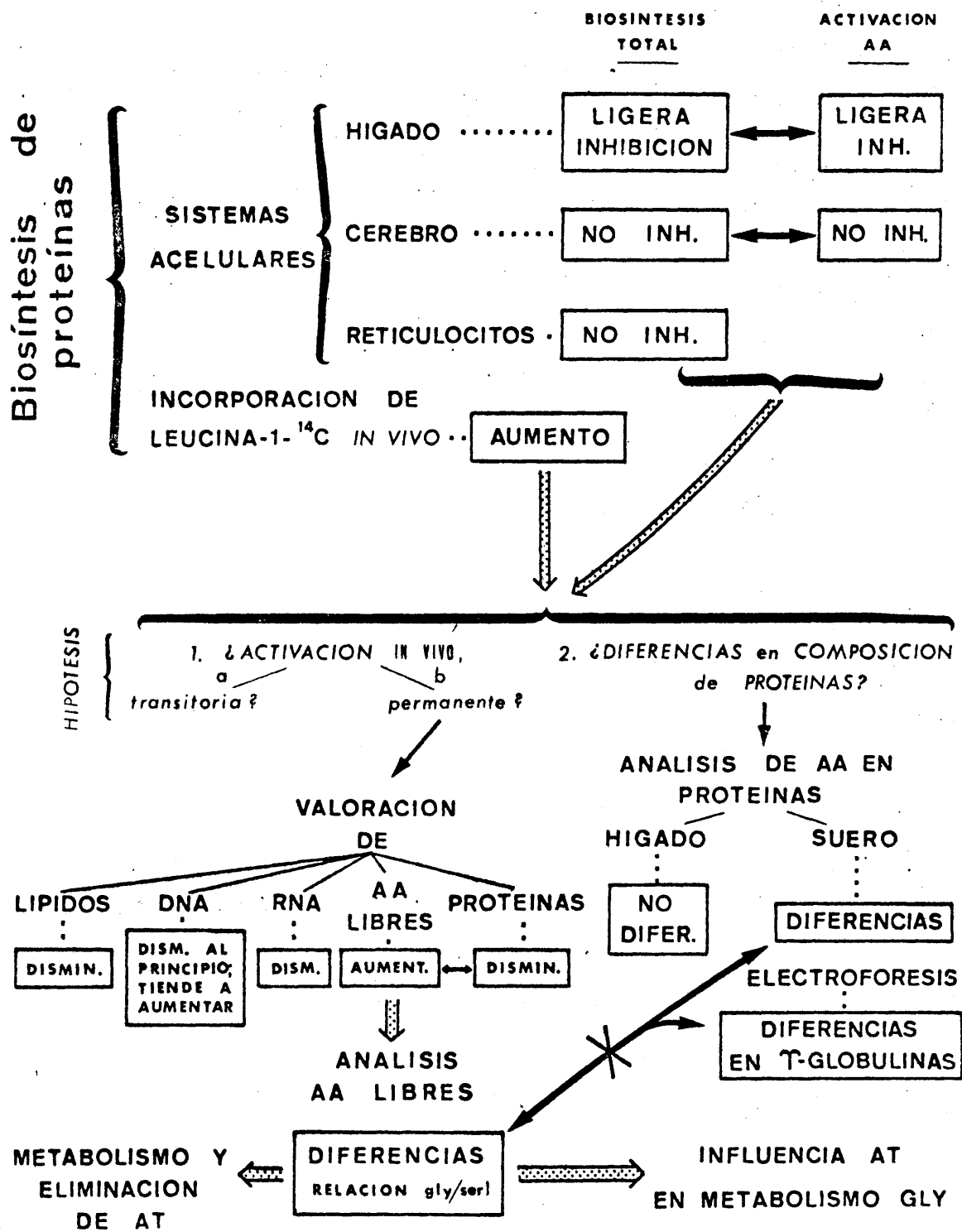


Figura 21

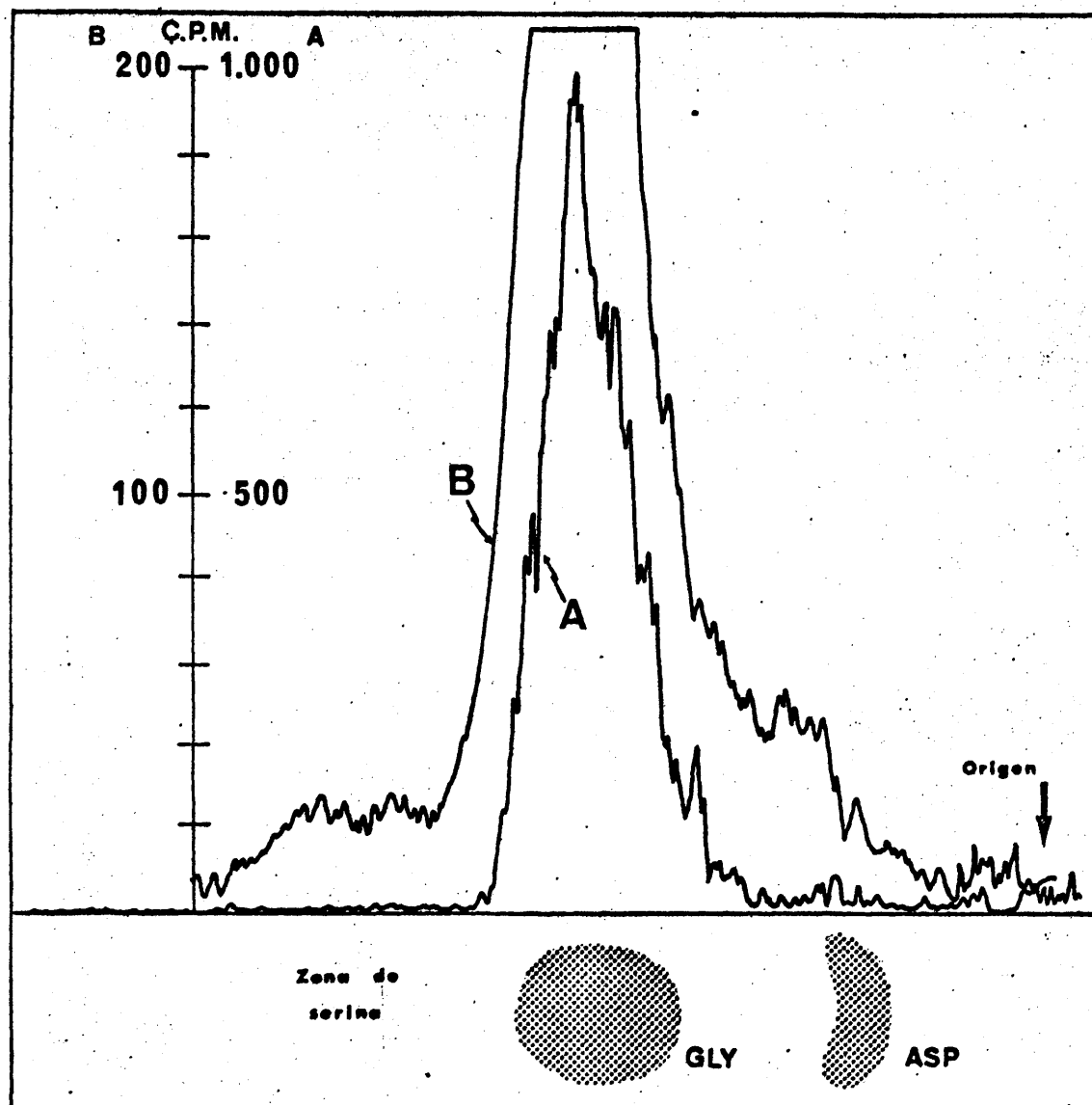


FIGURA 22.- Transformación de glicocola en serina; incubación de control. En la parte inferior se representa el cromatograma revelado con ninhidrina y en la superior el registro automático de radiactividad. Curva Z: colimador, 6.0 mm; velocidad de registro, 61 cm/hora; constante de tiempo, 10 segundos; escala, 1000 cpm. Curva B: colimador, 1.5 mm; velocidad de registro, 15 cm/hora; constante de tiempo, 50 segundos; escala, 200 cpm.

aspártico, cistina y glutamina. La peculiar coloración de esta zona al revelar con ninhidrina, hace sospechar la preponderancia del ácido aspártico sobre los otros aminoácidos. No se observa mancha en la zona correspondiente a la serina aunque sí una ligera ondulación del registro de radiactividad (figura 22A), que demuestra la síntesis de serina a partir de glicocola. Es posible detectar más claramente la actividad presente en la zona de serina variando las condiciones de contaje (figura 22B).

De todas formas, la conversión de glicocola en serina es escasa, lo que hace difícil su determinación cuantitativa aunque la resolución cromatográfica sea aceptable. La misma situación se presentó en los cromatogramas de muestras incubadas en presencia de amitrol. En el que, acompañado de su registro, se representa en la figura 23 se aplicó doble cantidad de muestra, lo que permitió apreciar la mancha de serina al revelar con ninhidrina, aunque la evaluación cuantitativa tampoco resulta posible.

El contaje de las proteínas aisladas después de la incubación refleja una débil incorporación de glicocola (tabla LIV). Los valores obtenidos son lo suficientemente bajos para impedir el establecimiento de conclusiones definitivas, pero parecen apoyar las observaciones realizadas con sistemas purificados de hígado de cobaya (véase 3.1.2).

TABLA LIV

ACTIVIDAD INCORPORADA POR PROTEÍNAS DE HOMOGENEIZADO TOTAL DE
HIGADO DE COBAYA

<u>Muestra N°</u>	<u>Contenido</u>	<u>Actividad (cpm) (*)</u>
1	Control	19 ± 3
2	Control	18 ± 3
3	Amitrol	21 ± 4
4	Amitrol	19 ± 3

(*) Determinada a espesor infinito en plachetas de 1 cm².

Las diferencias entre aquellos resultados y los presentes son consecuencia no solamente de operar con homogeneizados totales en vez de

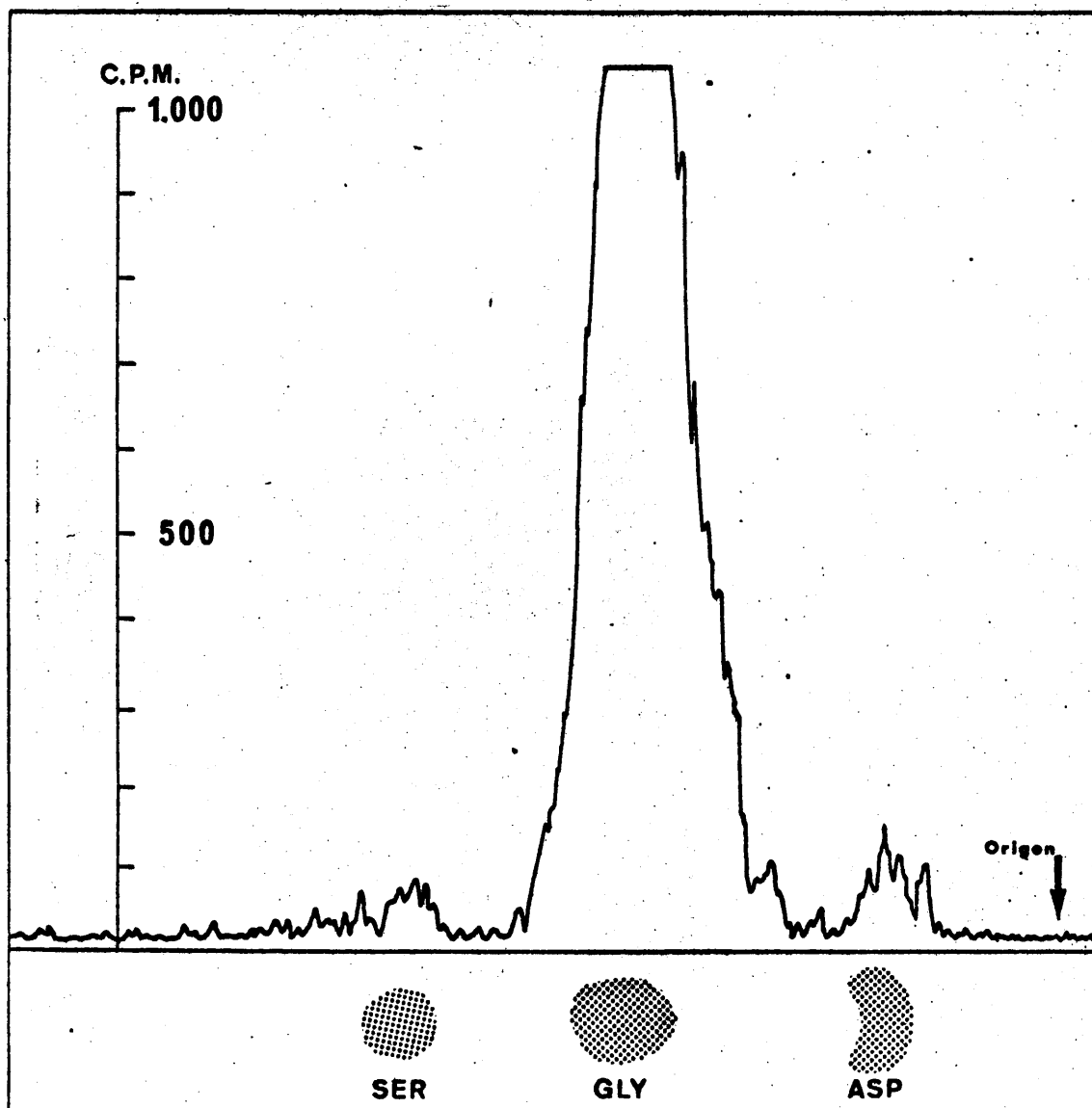


FIGURA 23.- Transformación de glicocola en serina en presencia de amfetrol 0.1 M. El registro de actividad se ha obtenido a 61 cm/hora con un colimador de 6 mm, una constante de tiempo de 10 segundos y una escala de 1000 cpm.

sistemas ribosomales, sino también de que la proporción de glicocola en proteínas hepáticas es inferior a la de leucina.

Con el fin de obviar las dificultades encontradas en la determinación cuantitativa del metabolismo de glicocola se realizó la experiencia 2 en la que -como se ha indicado en 2.3.1.1- se aumentó la concentración de glicocola- ^{14}C y el tiempo de incubación.

Sin embargo, la precipitación con etanol resultó menos eficaz que la efectuada con ácido tricloroacético y, probablemente debido a la presencia parcial de lípidos, los cromatogramas presentan peor resolución que en la experiencia anterior. Siguen observándose las mismas zonas radiactivas, sin que la presencia de ácido fólico mejore el rendimiento de la síntesis de serina. La incorporación de glicocola a proteínas, por razones evidentes, se detecta mucho mejor que en la experiencia anterior. Las proteínas aisladas de muestras incubadas en presencia de amitrol tenían una actividad, medida en las condiciones indicadas al pie de la tabla LIV, de 135 ± 14 cpm de las de control. Estos resultados están plenamente de acuerdo con todos los descritos en la sección 3.1.

El conjunto de las experiencias 3 y 4 permitió obtener las conclusiones que se exponen a continuación. La separación cromatográfica de los productos de reacción es buena excepto si la precipitación se realiza con etanol, pero, dada la pequeña cantidad de glicocola transformada la exploración automática de las zonas radiactivas del cromatograma -tanto si es de papel como de capa fina- no permite una resolución suficiente para obtener datos cuantitativos. Por razones instrumentales es más fácil llegar a la obtención de estos datos mediante cromatografía en capa fina, ya que el equipo de contaje empleado para este fin permite determinar la actividad de zonas parciales del cromatograma.

Por otra parte, al incubar en medios aerobios la adición de ácido fólico o su derivado tetrahidrogenado no aumenta el rendimiento de la biosíntesis de serina.

La purificación previa del sobrenadante por cambio de ión no mejora la resolución de los cromatogramas y, por otra parte, conduce a la pérdida parcial de los aminoácidos de menor afinidad por la resina. En las condiciones experimentales descritas, parte del ácido aspártico se pierde en la fase de lavado con agua, como se pudo comprobar por la aparición de actividad en las fracciones no retenidas y cromatografía de éstas.

Con todos estos datos se procedió a la realización de una experiencia definitiva con homogeneizado obtenido de hígado de rata, como se describe en el apartado siguiente.

3.7.1.2. Incubación con homogeneizado de hígado de rata.

Por las razones expuestas anteriormente sólo se da cuenta de los resultados obtenidos en el conteo de los cromatogramas de sobrenadantes no purificados por cambio de ión. En la tabla LV se recogen estos resultados expresados como porcentaje de la actividad total en cada una de las zonas radiactivas del cromatograma.

TABLA LV

INFLUENCIA DEL AMITROL 5.10^{-3} M SOBRE EL METABOLISMO DE GLICOCOLA
"IN VITRO".

Muestras	% de la actividad total (*)		
	asp	gly	ser
Control	8.4	82.8	8.8
Amitrol	7.9	84.0	8.0
(*) Medias de dos determinaciones			

3.7.1.3. Discusión.

De todos los datos expuestos y, en especial, de los contenidos en la tabla LV puede concluirse que el amitrol no altera apreciablemente el metabolismo de glicocola, ni en su conversión en serina, ni en las transformaciones posteriores de este último aminoácido. Así pues, las variaciones encontradas en la relación entre glicocola y serina libres no pueden justificarse por una modificación directa de la serina hidroximetiltransferasa.

Puede pensarse, no obstante, en algún efecto de regulación cuya acción, ejercida "in vivo", se deba a alguna causa distinta a la inhibición enzimática directa por parte del amitrol. Para dilucidar este extremo se plantearon las experiencias que se describen a continuación. En ellas, en vez de añadir amitrol al medio de incubación "in vitro" se investigó el efecto del tratamiento "in vivo" con dicha sustancia sobre

el metabolismo de glicocola en preparados obtenidos de animales tratados.

3.7.2. Experiencias "in vitro" con homogeneizados totales de hígado de animales tratados.

Se realizaron de la forma descrita en la sección 2.3.2. Se obtuvo una buena resolución de los aminoácidos como puede observarse en la figura 24, que representa uno de los cromatogramas realizados. La mancha de R_f 0.26 puede corresponder a asparagina o glutamina, cuyas movilizaciones son muy semejantes en el sistema de disolventes empleado. La de R_f 0.32 y la de R_f 0.46 corresponden respectivamente a glicocola y serina, como pudo apreciarse, además, por el comportamiento de testigos. La mancha intermedia puede deberse a alanina, histidina o lisina, cuyos R_f prácticamente coinciden (0.37, 0.39 y 0.36 respectivamente). Ni las ambigüedades citadas ni el resto de las zonas del cromatograma tienen importancia en la presente discusión por cuanto no se apreció actividad alguna en ellas. Como en los casos anteriormente descritos, el metabolismo de glicocola progresó muy poco (más del 85% de la actividad total del cromatograma pertenecía al aminoácido inalterado) por lo que resultó difícil obtener resultados cuantitativos seguros. Para evitar esta dificultad, se procedió al aislamiento de L-serina: tetrahidrofólico 5,10-hidroximetiltransferasa (E.C. 2.1.2.1) (serina hidroximetiltransferasa) -enzima que cataliza la síntesis de serina a partir de glicocola y (C)- de animales normales y tratados con amitrol como se describe en la sección siguiente.

3.7.3. Experiencias con preparados enzimáticos purificados

El tratamiento a que se refiere el último párrafo del apartado anterior fue de 8 días de duración, durante los cuales los animales recibieron 5 dosis de amitrol de 1 g/kg.

El método utilizado para la valoración de serina sintetizada resultó eficaz, ya que este aminoácido eluye a un tiempo suficientemente distinto del de la glicocola para que, aún en el caso de que queden cantidades importantes de ésta sin transformar, no se aprecien interferencias en el cromatograma. Determinada de esta manera, la actividad de la preparación enzimática se expresó en unidades arbitrarias. Una unidad se definió como la cantidad de enzima capaz de transformar en una hora, en las condiciones experimentales utilizadas, 1 nmol de glicocola en serina. En la tabla LVI se recoge la actividad de serina hidroximetiltrans-

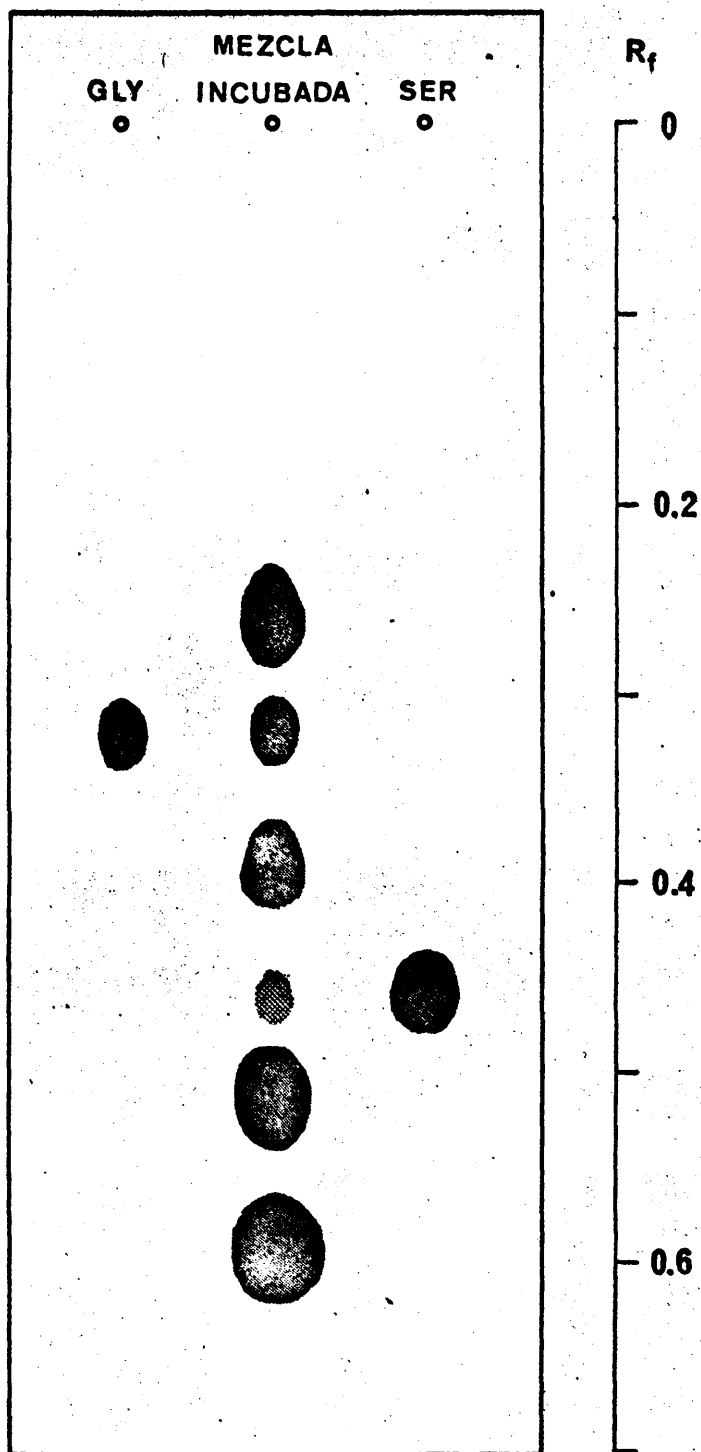


Figura 24

ferasa en hígado de ratas normales y tratadas con amitrol, expresada como unidades por miligramo de proteína en el preparado enzimático y unidades por gramo de tejido seco. Puede verse en ella que, aunque los valores medios sean algo diferentes, la dispersión de los resultados no permite concluir que el amitrol altere la síntesis enzimática de serina a partir de glicocola.

Por consiguiente, las variaciones que se han observado en la relación glicocola/serina no pueden obedecer simplemente a alteraciones en la interconversión de estos aminoácidos que, a juzgar por los datos reseñados en todo este capítulo, debe permanecer normal no sólo en incubaciones con amitrol "in vitro", sino también después de tratamientos "in vivo" con dicha sustancia.

TABLA LVI

ACTIVIDAD DE SERINA-HIDROXIMETILTRANSFERASA EN HIGADO DE RATAS
NORMALES Y TRATADAS CON AMITROL

Grupo de aminales	Actividad de la enzima	
	U/mg de proteína	U/g de tejido seco
Control	20.9	667 ± 201
Amitrol	30.7	758 ± 253

3.8. ESTUDIO DEL METABOLISMO DE AMITROL

3.8.1. Obtención de derivados de amitrol en vegetales y microorganismos

Al objeto de comparar los productos del metabolismo de amitrol en mamíferos con los descritos en la bibliografía procedentes de vegetales y microorganismos se procedió al tratamiento de vegetales con amitrol y al cultivo de *Escherichia coli* 26-26 en presencia de dicha sustancia, en la forma descrita en la sección 2.4.2.

3.8.1.1. *Derivados del metabolismo de amitrol en vegetales.*

El extracto I, preparado del modo descrito en el apartado 2.4.2.1, se sometió a cromatografía descendente en papel Whatman n° 1, con el sistema de disolventes B (véase 2.4.1.1.) y se reveló con ninhidrina, reactivo de Ehrlich y reactivo "H". En la figura 25 se esquematiza el resul

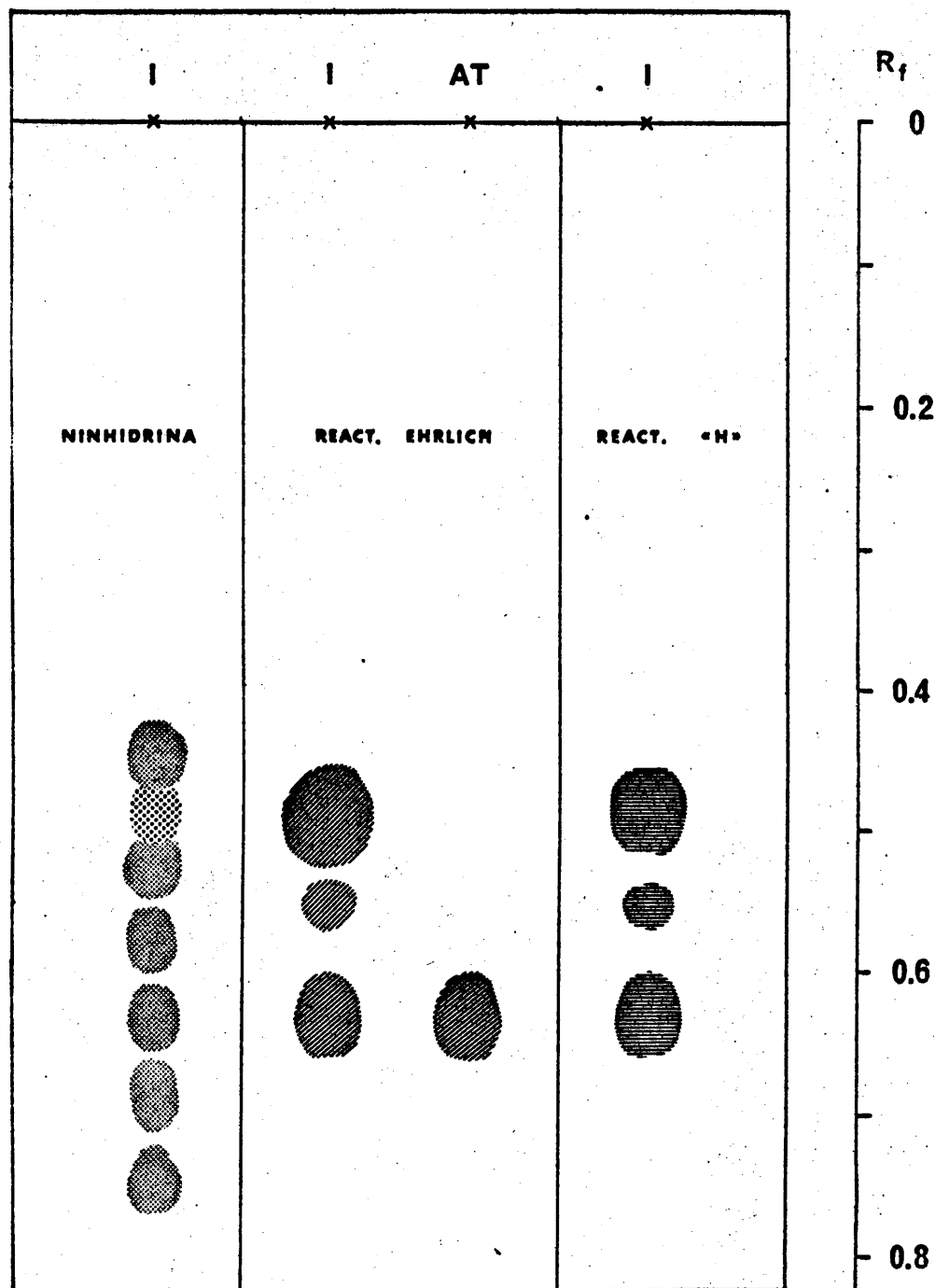


FIGURA 25.- Cromatografía en papel Whatmann n° 1 del "extracto I" de plantas tratadas con amitrol. Disolvente: sistema B (véase 2.4.1.1.). Reveladores: ninhidrina, reactivo de Ehrlich y reactivo "H".

tado de dicha cromatografía. La mancha que aparece en las zonas reveladas con reactivo de Ehrlich y con el reactivo "H" a R_f 0.63 es indudablemente amitrol como se desprende de la comparación con el comportamiento cromatográfico de una muestra pura de esa sustancia.

Aparecen, además, dos manchas de reacción positiva con Ehrlich y "H", cuyos R_{AT} son 0.76 y 0.86. Provisionalmente se designaron estos derivados como 1 y 2 respectivamente. Sólo el primero de ellos parece dar reacción positiva con ninhidrina, pero, ya que la resolución de la cromatografía monodimensional efectuada no es suficiente para dilucidar este extremo, se procedió al desarrollo bidimensional del extracto I en capa fina de celulosa según el método expuesto en 2.2.5. Se desarrollaron simultáneamente dos placas, de las cuales una se reveló con ninhidrina y la otra con el reactivo "H". En la figura 26 se recogen superpuestos los esquemas de ambas placas. El derivado 1 parece, en efecto, dar reacción positiva con ninhidrina. La coincidencia perfecta entre las manchas obtenidas con este reactivo y con el "H" constituyen un fuerte apoyo para esta superposición. Queda, no obstante, una duda: la cistina migra, en el sistema bidimensional utilizado, a una posición semejante a la del derivado 1. Más adelante se dará cuenta de las experiencias realizadas para aclarar esta incertidumbre.

Ya que la cantidad de amitrol inalterado en los tejidos vegetales es importante, para evitar su interferencia con la separación cromatográfica de los derivados 1 y 2, se procedió a una purificación parcial previa del extracto I mediante cromatografía preparativa descendente en papel Whatman 3MM con el sistema de disolvente B. La distribución de manchas obtenidas al revelar con reactivo de Ehrlich los bordes del cromatograma correspondiente a los extremos de la línea de aplicación, es semejante a la indicada en la figura 25, si bien la mayor cantidad de muestra aplicada va en detrimento de la resolución (figura 27). Las zonas marcadas en dicha figura se eluyeron separadamente con agua y se recromatografiaron, utilizando la técnica ascendente en papel Whatman n°1.

Los resultados de las cromatografías se recogen en la tabla LVII en la que se indica, además del número de manchas obtenidas al revelar con reactivo de Ehrlich su R_{AT} reacciones con ninhidrina y "H" y su abundancia relativa. Puede observarse que, además de los dos derivados más importantes 1 y 2, puestos ya de manifiesto por las cromatografías ante

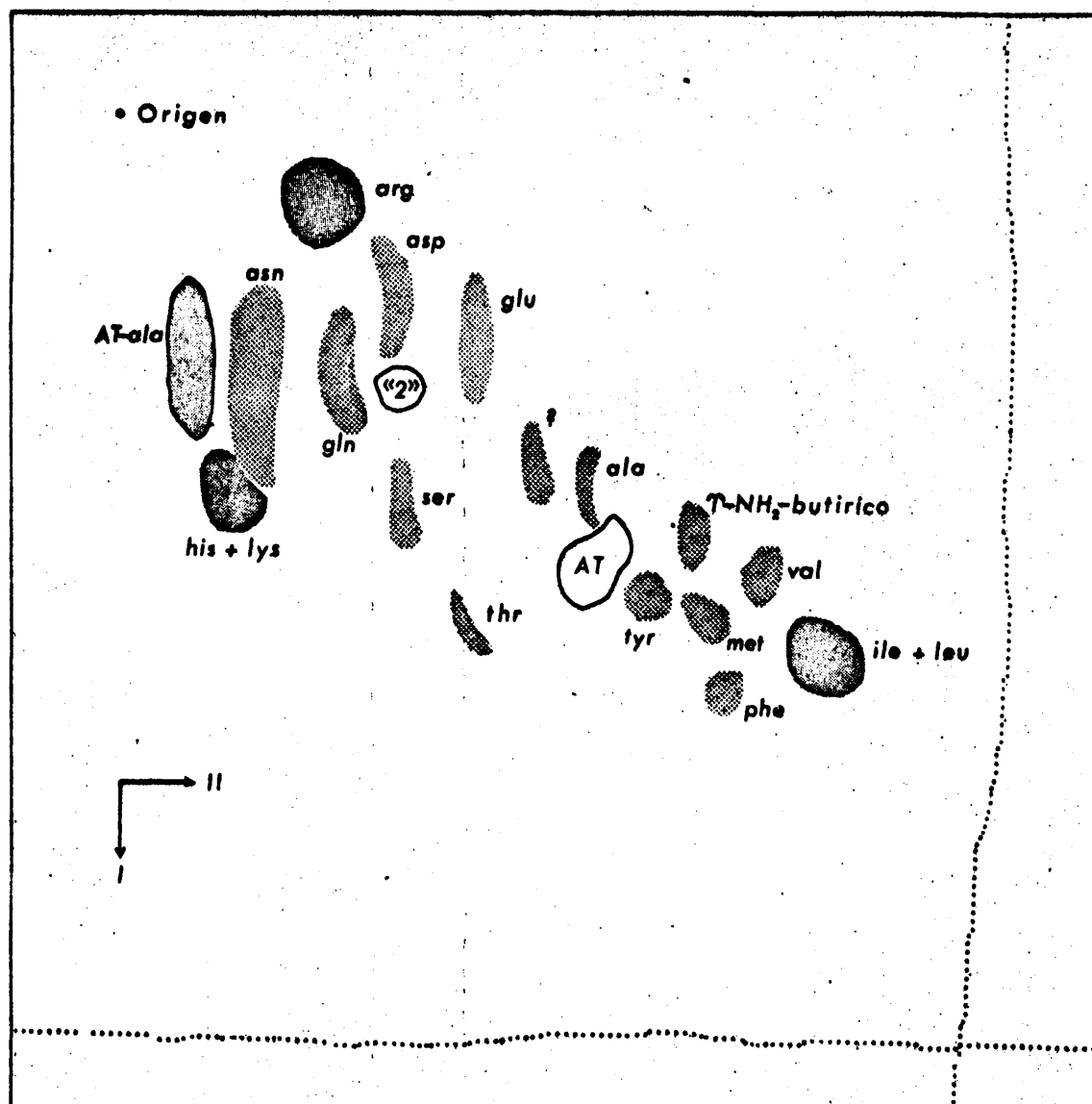


FIGURA 26.- Cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa del "extracto I" de plantas tratadas con amitrol. Las zonas punteadas indican las manchas puestas de manifiesto al revelar con ninhidrina y las rodeadas de un trazo continuo representan las que adquieren color rojizo al revelar con reactivo "H". Los sistemas de disolventes empleados son los descritos en la sección 2.2.5.

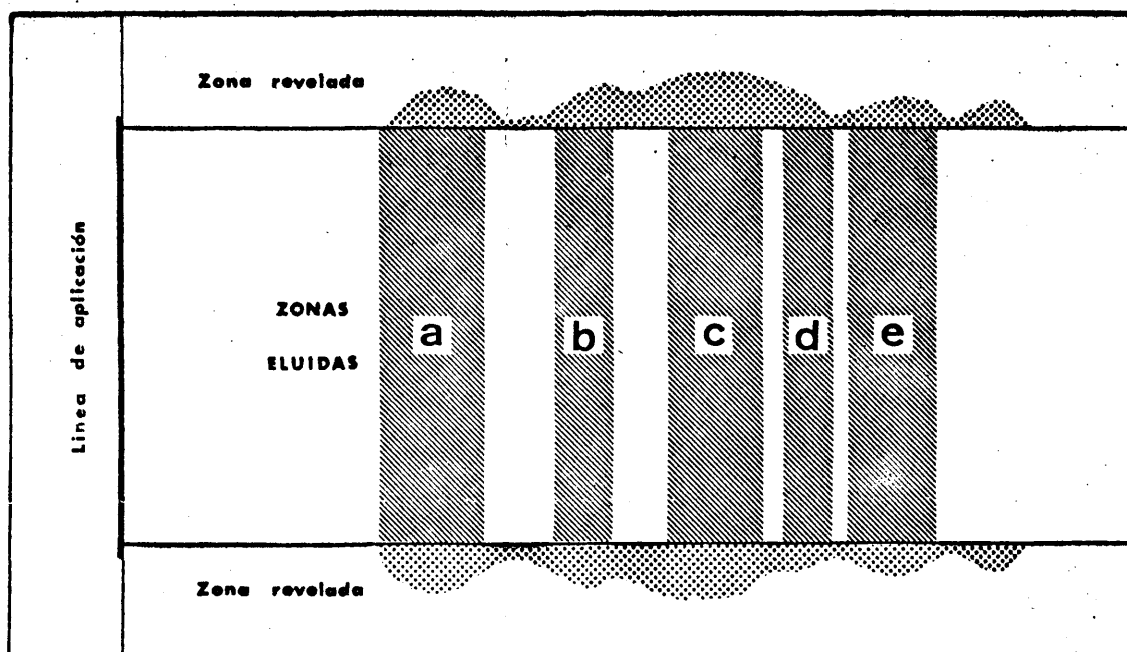


FIGURA 27.- Cromatografía preparativa sobre papel del "extracto I" de plantas tratadas con amitrol.

TABLA LVII

DERIVADOS DEL METABOLISMO DE AMITROL EN VEGETALES.

SEPARACION POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL. SISTEMA B.

<u>Zona (1)</u>	<u>Derivado</u>	<u>R_{AT} (2)</u>	<u>Reacción con</u>		<u>Abundancia</u>
			<u>ninh.</u>	<u>"H"</u>	<u>relativa</u>
a	1	0.70 - 0.75	+	+	+++
	3	0.45	-	+	+
b	1	0.74	+	+	+++
c	2	0.77 - 0.80	?	+	+++
d	2	0.77 - 0.80	?	+	+++
	4	0.95	-	+	+
e	AT	1.00	-	+	+++

(1). Según el esquema de la figura 27.

(2). Medido sobre las manchas reveladas con reactivo de Ehrlich.

riores, aparece por lo menos uno nuevo, designado como 3, que se encuentra presente en proporción muy escasa. La mancha que aparece a R_{AT} 0.95 al cromatografiar el eluido de la zona d y que en la tabla LVII se designa como "derivado 4" puede ser en realidad amitrol. Aunque en ninguna de las cromatografías realizadas coincide exactamente su R_f con el de esa sustancia, la escasa proporción en que se encuentra impidió, en el momento de la investigación referido, la aplicación de otros métodos analíticos (véanse, no obstante, las razones que, a favor de la existencia de este cuarto derivado, se dan más adelante).

Aunque de los datos de la tabla LVII se desprenda la identificación de alguno de los derivados con los ya descritos en la bibliografía, se pospondrá esta identificación hasta la exposición total de todas las técnicas analíticas utilizadas.

Una vez obtenida la información indicada, se procedió a la separación de derivados de amitrol por cromatografía de cambio de ión del extracto I según la técnica expuesta en 2.4.2.1. Las fracciones 28-42 y 57-62 de la cromatografía previa dieron reacción positiva con reactivo "H", por lo que se recogieron y se cromatografiaron, esta vez sobre pa-

pel (Whatman n°1, técnica ascendente) con el sistema de disolventes B. En la tabla LVIII se indican los R_{AT} de los derivados de amitrol presentes en cada una de las fracciones.

A la vista de esos resultados, queda pues aclarada la existencia real de cuatro derivados. El amitrol eluye en las fracciones 57-62, netamente separado de sus derivados, por lo que la sustancia de R_{AT} 0.91-0.97 presente en las fracciones 28-30 (derivado 4, según la designación anterior) no puede, en modo alguno, identificarse con él. Se trata de un derivado no descrito hasta la fecha, sin duda por su escasa proporción y por la proximidad de su R_f al del amitrol.

El derivado 2 eluye a continuación en una zona muy extensa (fracciones 31-42) y su R_{AT} (0.76-0.85) permite identificarlo con el derivado I

TABLA LVIII

CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION POR CAMBIO DE ION DE EXTRACTOS DE PLANTAS TRATADAS CON AMITROL.

<u>Fracción n°</u>	<u>R_{AT} de los derivados y abundancia relativa^(*)</u>		
28	0.91(d)		
29	0.95(d)		
30	0.97(d)		
31	0.85(d)		
32	0.85(d)		
33	0.86(d)		
34	0.86(d)		
35	0.85(m)	0.70(d)	
36	0.83(m)	0.71(d)	
37	0.80(i)	0.71(m)	
38	0.80(i)	0.69(m)	0.41(d)
39	0.81(i)	0.64(m)	
40	0.80(i)		0.42(d)
41	0.78(m)		
42	0.76(d)		
57 - 62	1.00(i)		

(i) = mancha intensa; (m) media; (d) débil.

de Herrett y Linck (9, 520), para el que se ha descrito en la bibliografía un R_{AT} de 0.75-0.80 (507). El derivado 1 eluye en las fracciones 35-39 y su R_{AT} en el sistema utilizado es de 0.64-0.71. De reacción positiva con ninhidrina lo que, junto con su comportamiento cromatográfico, conduce a su identificación con el derivado II de Herrett y Linck (9, 520) cuyo R_{AT} en el sistema B es de 0.65-0.70 (16, 507; véanse, además, las tablas I y II). Como se ha comentado en la primera parte de esta memoria, este derivado es, a su vez, idéntico a la amitrolil-alanina de Massini (11, 15, 16).

Finalmente, el derivado 3, de R_{AT} 0.42-0.45, que eluye en las fracciones 38-40 puede ser el X de Racusen (7) aunque no se ha podido detectar reacción del mismo con ninhidrina.

3.8.1.2. Estudio particular de la amitrolilalanina.

Una vez realizada esta cromatografía previa de identificación, se procedió a la separación preparativa del derivado 1. Para ello se repitió la separación por cambio de ión como se ha descrito en 2.4.2.1, y las fracciones que contenían el citado derivado se recromatografiaron en columna de celulosa que se eluyó con el sistema B. Las fracciones 18-21 de esta nueva cromatografía contenían un único derivado de amitrol, cuyo R_{AT} en cromatografía ascendente fue de 0.64-0.68 en el sistema B y 0.35-0.40 en el sistema E. El derivado 1 se aisló del conjunto de esas fracciones por evaporación del disolvente y se recrystalizó de etanol-agua.

Una muestra pura de este derivado se sometió a cromatografía automática en un analizador de aminoácidos siguiendo los métodos expuestos en la parte experimental. La amitrolil-alanina eluye en una posición coincidente con la de la valina cuando se utiliza el método de análisis de aminoácidos libres y coincide con la alanina en el procedimiento de análisis de hidrolizados de proteínas. En la figura 28 se recoge el cromatograma de una muestra de amitrolilalanina desarrollada por este último procedimiento en presencia de 0.2 μ moles de cada uno de los aminoácidos proteicos. El amitrol, cromatografiado en las mismas condiciones, y detectado por el método original descrito en el apartado 2.4.1.3, no es capaz de eluir con el tampón de citrato sódico 0.2 N, pH 4.25 y sólo lo hace en las condiciones requeridas para aminoácidos básicos en forma de un pico ancho situado inmediatamente antes de lisina (figura 29). La de

FIGURA 28

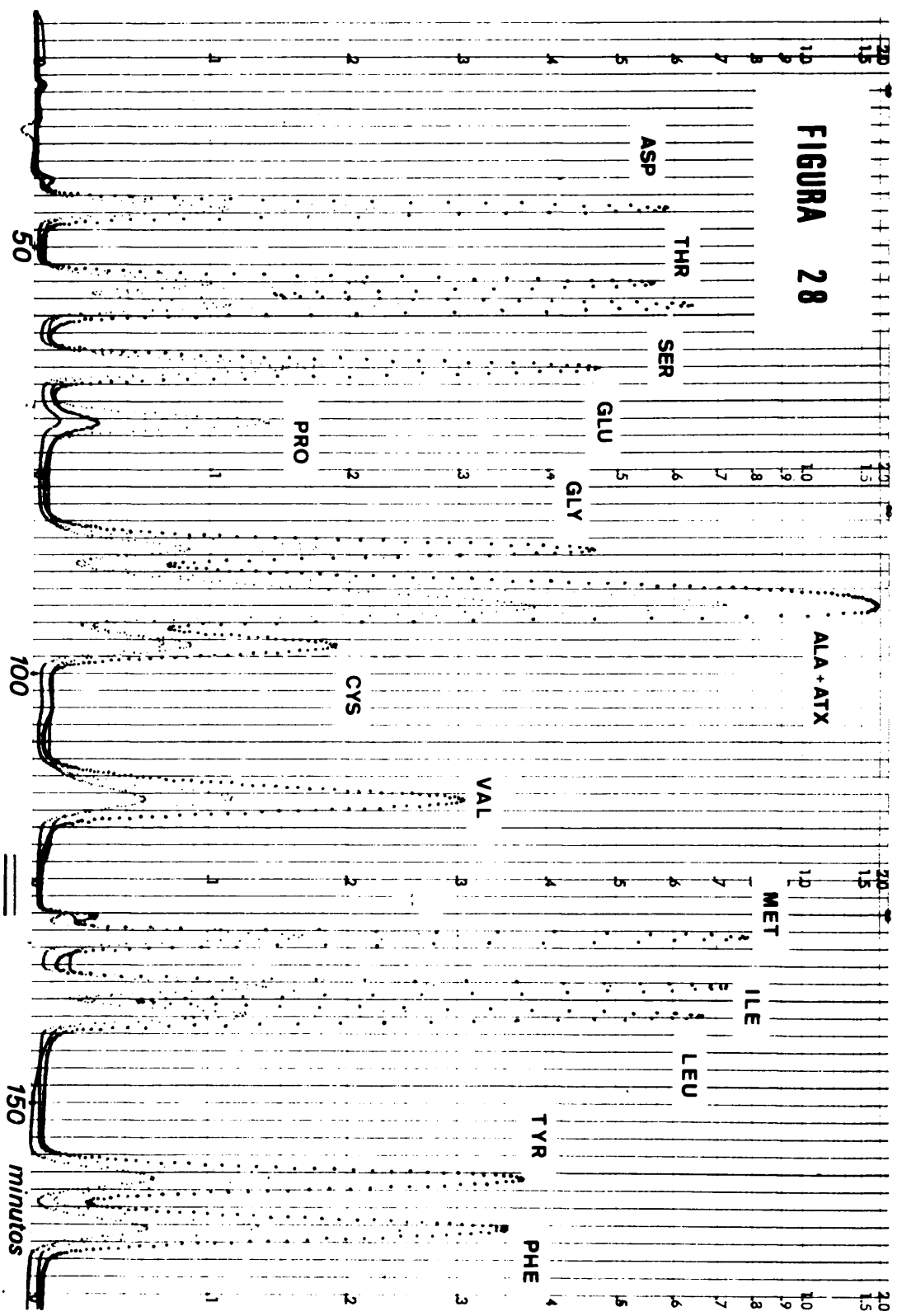
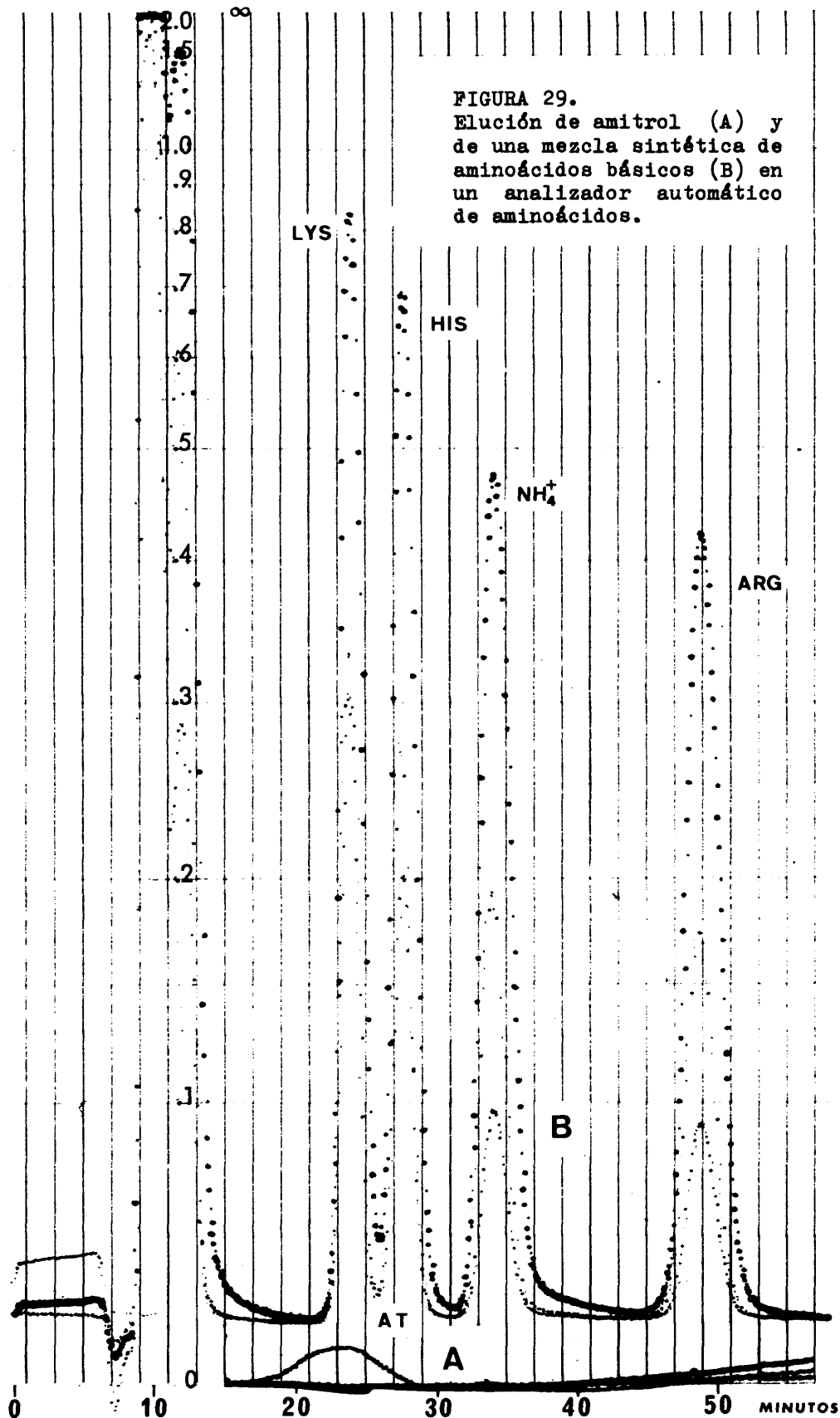


FIGURA 29.
Elución de amitrol (A) y
de una mezcla sintética de
aminoácidos básicos (B) en
un analizador automático
de aminoácidos.



tección es posible ya que el producto de reacción entre el amitrol y el reactivo de Ehrlich modificado del que se ha hecho uso aunque tiene un máximo de absorción a 404 nm, presenta a 440nm (longitud de onda del canal 2 de Unichrom) un coeficiente de extinción relativamente alto (aproximadamente igual a $0.7\epsilon_{404}$) (figura 30).

El pK_2 de la lisina es 8.95, mientras que el pK_1 del amitrol es 4.17 (521). El retraso en la elución de éste, se justifica por su estructura cíclica, que puede interaccionar fuertemente con el esqueleto aromático de la resina utilizada (poli(estireno-divinilbenceno)).

Este dato constituye una prueba adicional a favor de la identidad entre el derivado 1 y la amitrolilalanina. Massini calculó para esta última un pK_1 de 2.1 (11). Debería, por tanto, eluir con el tampón de pH 3.28, en una posición semejante a la del ácido aspártico ($pK_1 = 2.09$), pero su elución en la posición de la alanina ($pK_1 = 2.35$) se justifica plenamente, habida cuenta de las interacciones entre el núcleo de triazol y el esqueleto de la resina, puestas de manifiesto en la cromatografía de amitrol puro.

Con otra muestra del derivado 1 puro se realizó un espectro infrarrojo en pastilla de KBr (figura 31). Del examen del mismo se pueden obtener las conclusiones que se expresan a continuación. Las dos bandas que aparecen a 3380 y 3315 cm^{-1} pueden asignarse a vibraciones de tensión, antisimétrica y simétrica respectivamente, del enlace N-H de una amina primaria. Las frecuencias de estas bandas se ajustan a la ecuación empírica de Bellamy,

$$\bar{\nu}_s = 0.876 \bar{\nu}_{as} + 345.5$$

válida para aminas primarias. En un espectro de amitrol puro (figura 32) pueden observarse estas bandas a 3410 y 3330 cm^{-1} . También aparecen, aunque a frecuencias ligeramente distintas en el espectro de 1-acetilamitrol (figura 33). La comparación con el espectro del 3-acetilamitrol, en el que sólo se apreciaba una banda en la región de 3400-3300 cm^{-1} (figura 34), permite asegurar la asignación anterior.

La progresión de bandas que aparece en el espectro del derivado 1 entre 2700 y 200 cm^{-1} (hombro a 2690 y bandas débiles a 2330 y 2025 cm^{-1}) aparece indicativa de una estructura de aminoácido. Se trata de bandas debidas a alguna vibración, no bien asignada, del NH_3^+ que se presentan

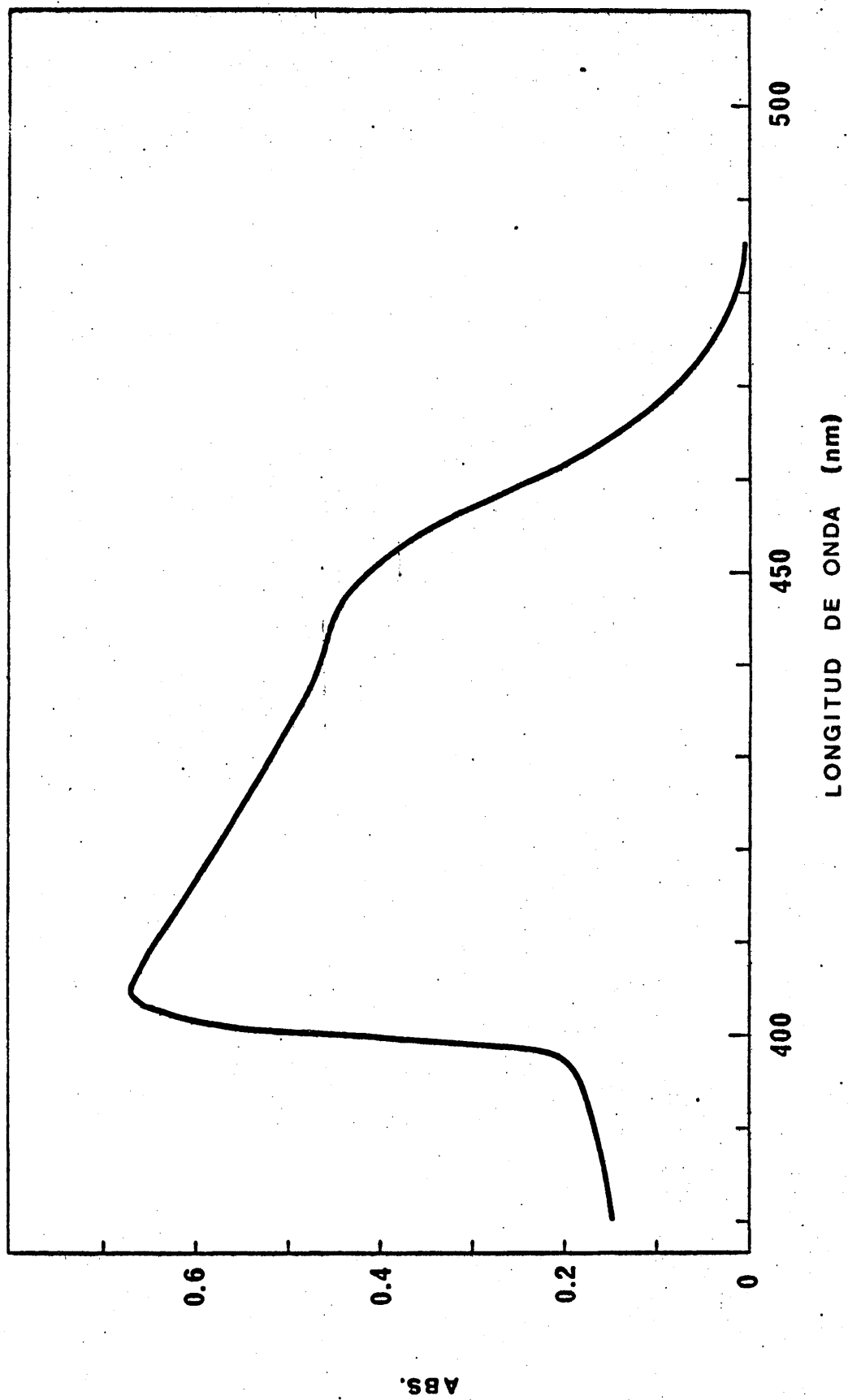
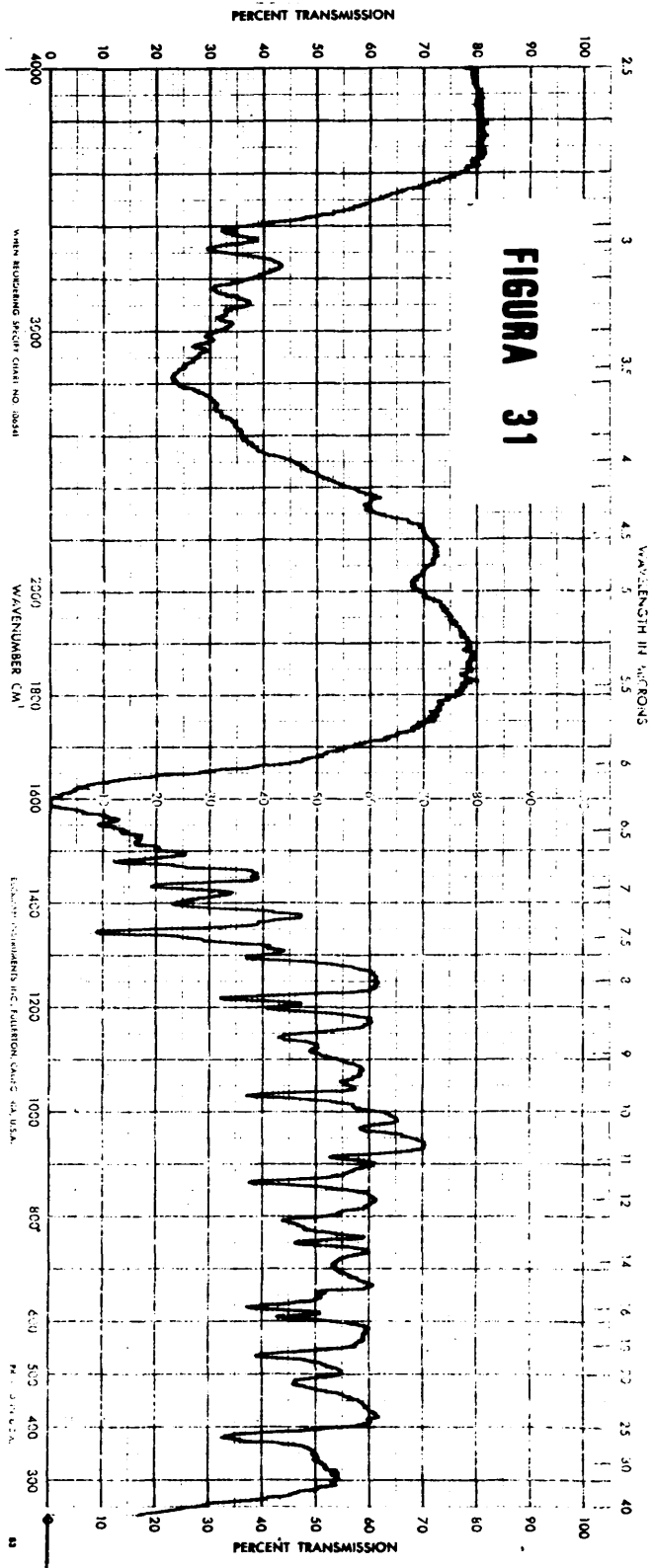
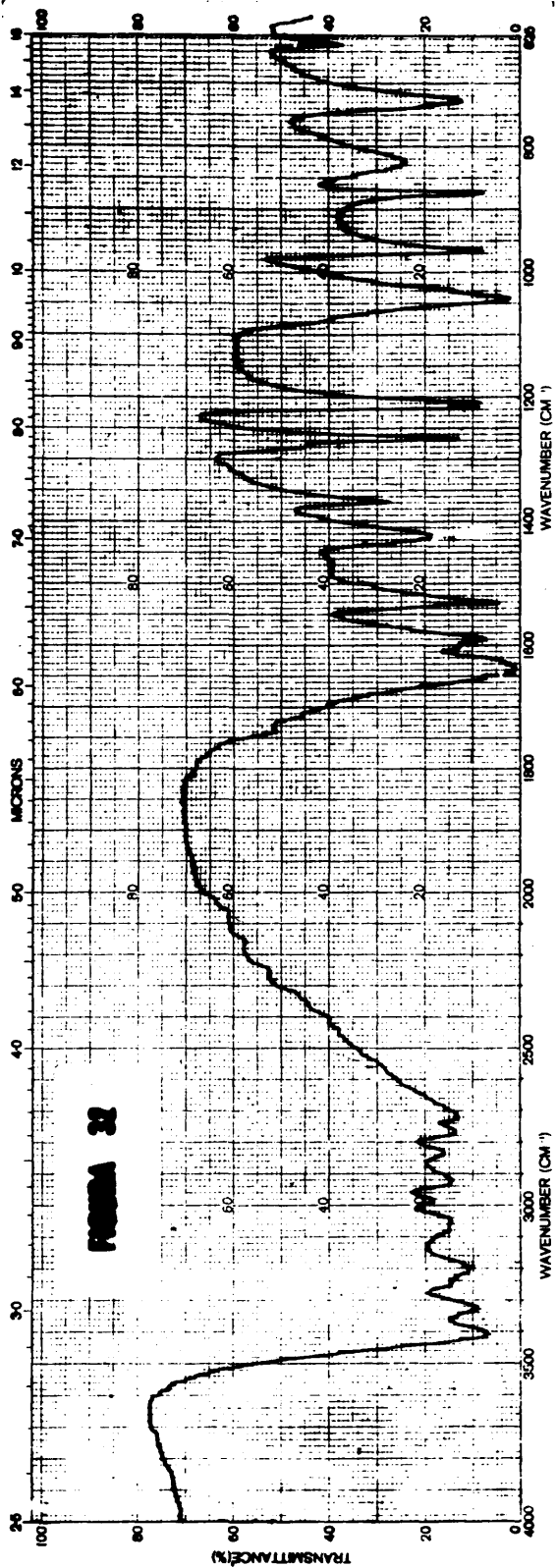
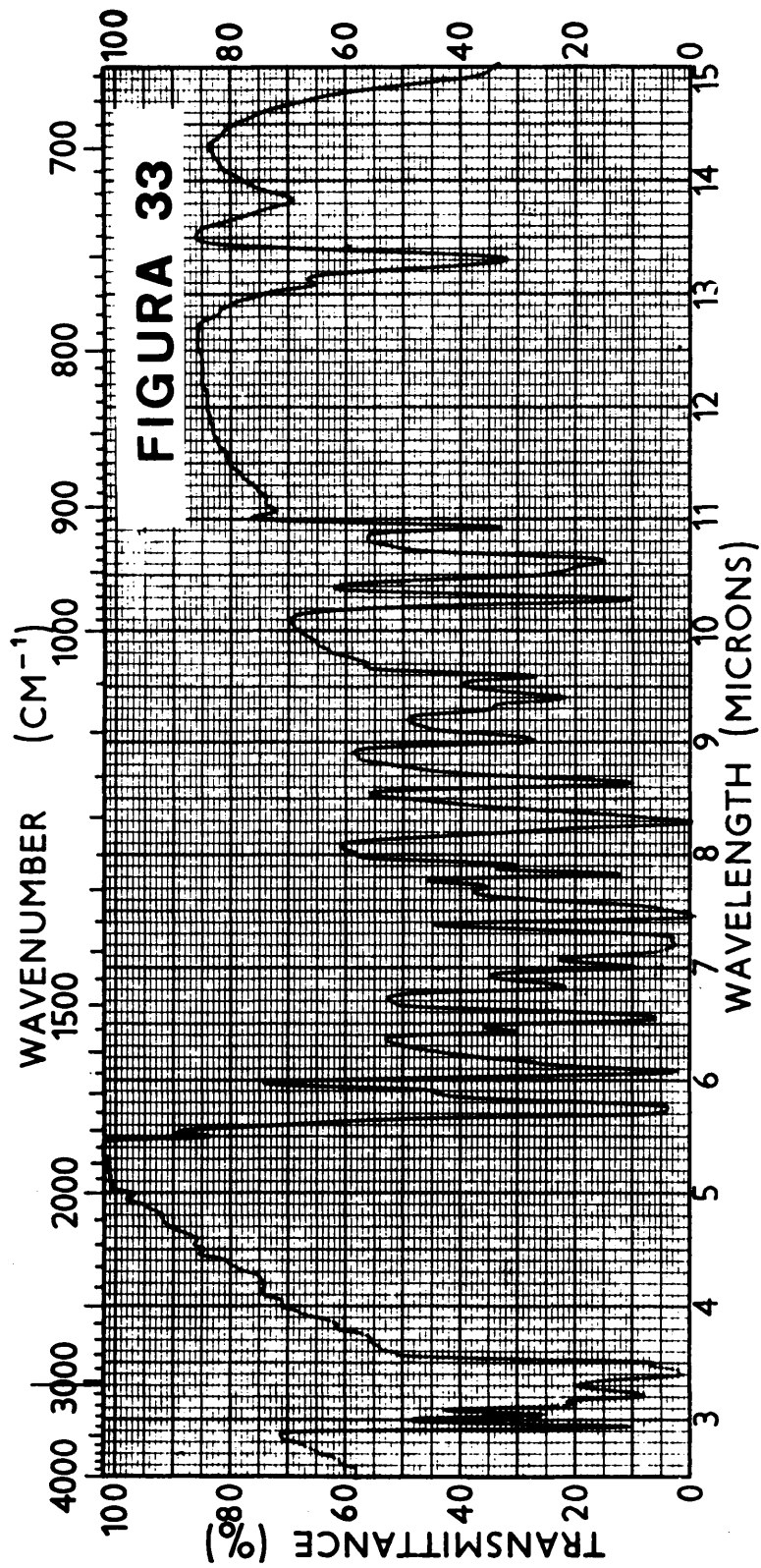
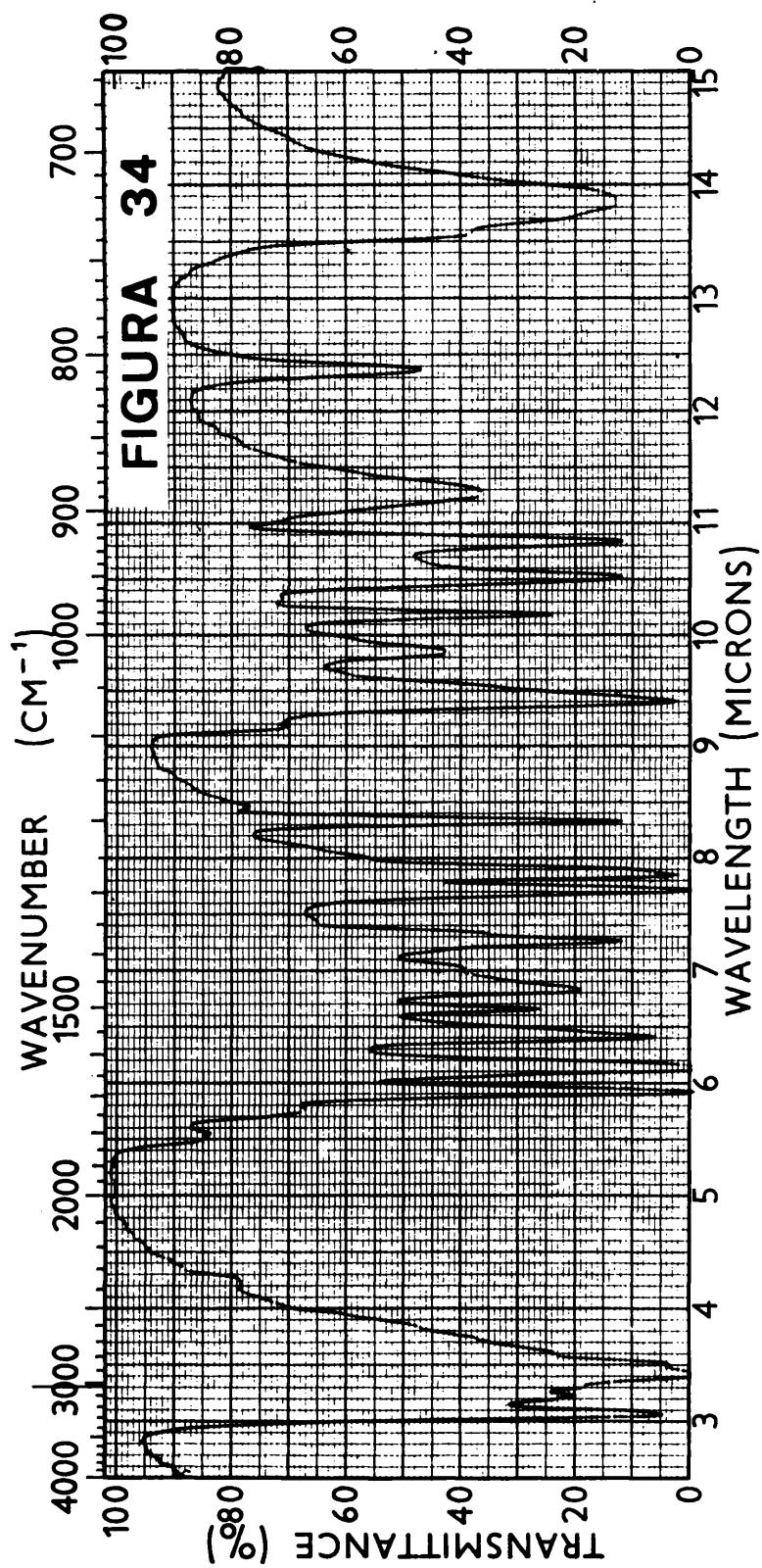


Figura 30









en todos los espectros de aminoácidos estudiados.

La banda de 1400 cm^{-1} puede identificarse como correspondiente a la vibración de flexión de los enlaces C-O en un anión carboxilato.

En el espectro del derivado 1 se puede apreciar también una banda que, aunque de asignación incierta, se encuentra tanto en el espectro de amitrol puro como en el de los derivados estudiados. Se trata de la de 3165 cm^{-1} . Una situación semejante se da con respecto a la banda de 1425 cm^{-1} . Se encuentra en el derivado 1, en el amitrol y en su derivado 1-acetilado, mientras que sólo se aprecia un hombro a esa frecuencia en el espectro de 3-acetilamitrol.

Todas estas observaciones indican que es compatible con el derivado 1 una estructura de amitrolilalanina. Dicho de otra forma, ya que la identidad entre el derivado 1 y el ATX de Massini se ha probado previamente por métodos cromatográficos, la espectroscopía infrarroja -que no se había usado hasta la fecha en el estudio del derivado- proporciona un nuevo argumento en favor de la estructura propuesta por Massini.

3.8.1.3. Derivados del metabolismo de amitrol en microorganismos.

Los cultivos de *E. coli* 26-26 se prepararon en la forma descrita en 2.4.2.2. En la figura 35 se han representado las curvas de crecimiento de los microorganismos de control y cultivados en presencia de amitrol. Puede observarse que en estos últimos el crecimiento está considerablemente retardado y ni siquiera al cabo de 100 horas de cultivo el número de bacterias es comparable al presente al término del crecimiento logarítmico normal.

La adición de adenina e histidina anula sólo en parte los efectos tóxicos del amitrol. El microorganismo crece después de una fase estacionaria de unas 20 horas para llegar a la fase de lisis 45 horas después de la adición de adenina e histidina. La lisis tiene lugar cuando el número de bacterias es aún bajo si se compara con el crecimiento normal, pero el microorganismo puede incluso llegar a reestructurarse.

Por el contrario, la adición de serina no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *E. coli* 26-26 en presencia de amitrol al 0.1%.

El estudio cromatográfico completo del medio de cultivo de bacterias crecidas en presencia de amitrol es difícil debido a la concentración, relativamente alta, de ácido diaminopimélico que libera el microorganismo utilizado. Este aminoácido, cuya presencia se detecta casi in

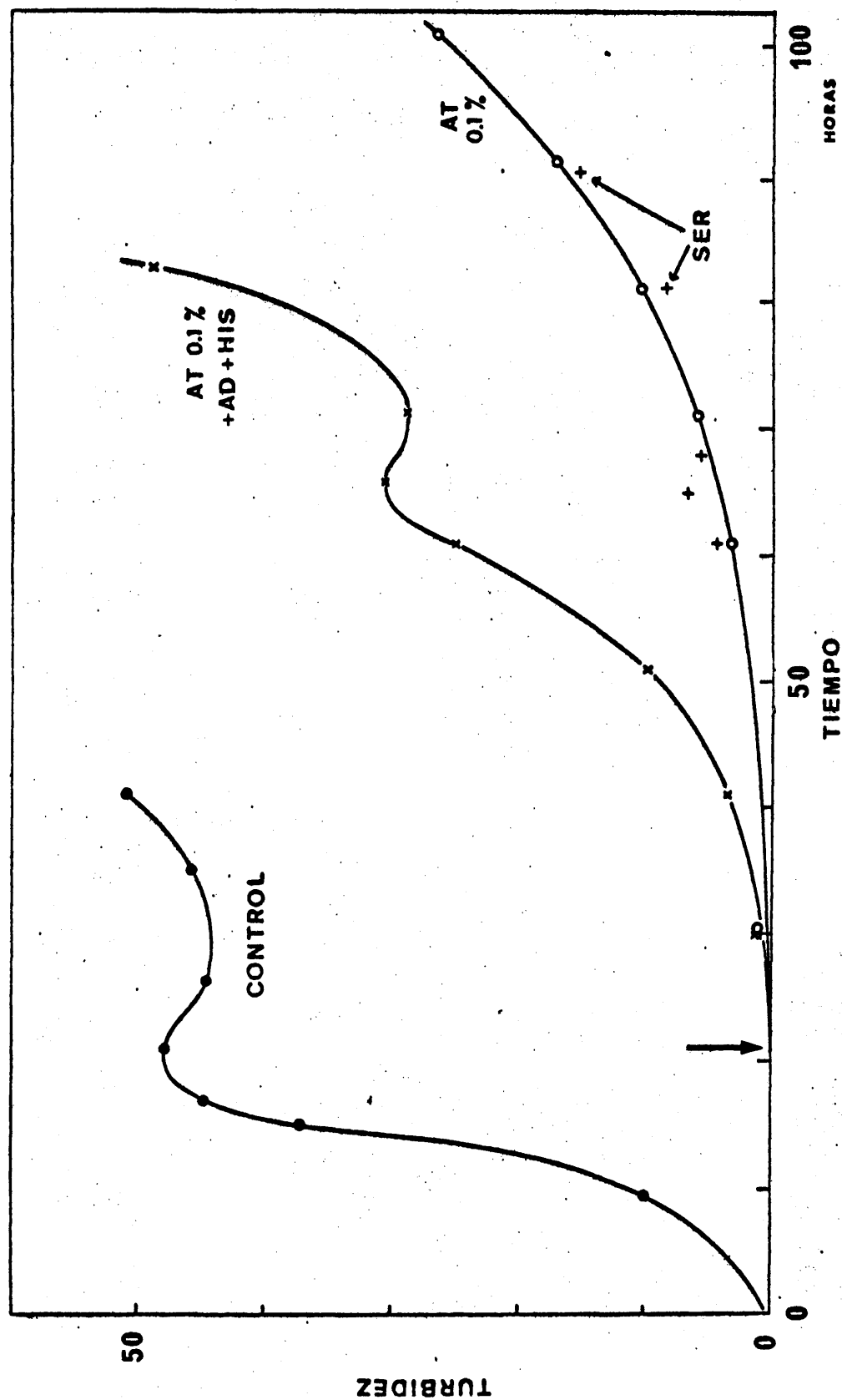


FIGURA 35.- Crecimiento de *E. coli* 26-26 en presencia de amitrol al 0.1%. La flecha indica el momento en que se efectuaron las adiciones indicadas en el texto.

mediatamente después de la adición de adenina e histidina, tiene, en todos los sistemas estudiados un R_f muy semejante al de la amitrolilalanina y su abundancia dificulta la detección con ninhidrina de este derivado del metabolismo de amitrol. Sin embargo, el revelado de los cromatogramas con reactivo de Ehrlich y sobre todo con el "H", específico de aminotriazoles, permite descubrir en todos los medios de cultivo de microorganismos crecidos con amitrol la presencia de cantidades variables de esta sustancia inalterada y dos derivados cuyos R_{AT} en el sistema B son 0.65 y 0.84. Se trata pues, de amitrolilalanina y el derivado 2, encontrados ya en vegetales en el transcurso de esta investigación. Su proporción relativa es variable según las adiciones que se hayan efectuado sobre el cultivo y la concentración relativa máxima de amitrolilalanina; se encuentra en los medios de cultivo de bacterias crecidas en presencia de serina. El resultado es lógico si se tiene en cuenta la participación de este aminoácido en la biosíntesis de amitrolilalanina (14, 16).

3.8.2. Metabolismo de amitrol en mamíferos

3.8.2.1. *Puesta a punto de técnicas de valoración de amitrol.*

En el apartado 2.4.1.2, b) se han mencionado los detalles experimentales de la modificación del método de Green y Feinstein (509). La necesidad del cambio de longitud de onda al valorar con ácido "H" en lugar de cromatrópico resulta evidente al observar el espectro visible del colorante desarrollado con el primero de los reactivos (figura 36). En las condiciones descritas se cumple la ley de Lambert-Beer en todos los intervalos de concentraciones de amitrol hasta un valor máximo de 50 $\mu\text{g/ml}$ (figura 37), por lo que la aplicabilidad de esta técnica es semejante a la de Green y Feinstein y pueden utilizarse indistintamente.

3.8.2.2. *Estudio de la eliminación de amitrol.*

El primer estudio sobre la eliminación de amitrol por animales tratados se realizó con los mismos animales utilizados para la experiencia de incorporación de leucina "in vivo" (véanse secciones 2.2.1 y 3.2.1). Los animales tratados recibieron amitrol por vía intraperitoneal los días 1°, 3°, 5° y 6° de la experiencia y se recogió su orina en los días 2°, 3°, 4°, 6° y 8°. La orina recogida se sometió directamente a cromatografía de papel, desarrollada con butanol-ácido acético-agua (63:10:27)

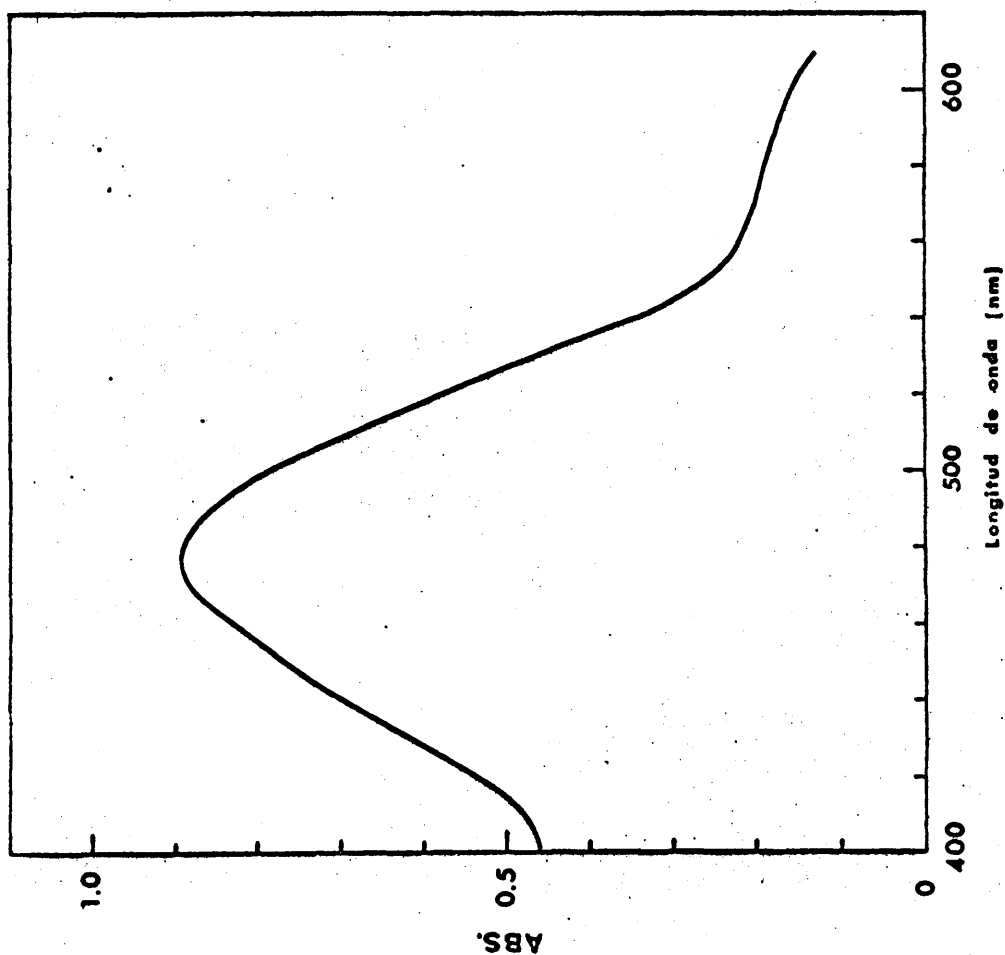


FIGURA 36.- Espectro del colorante desarrollado al valorar amitrol por la modificación del método de Green y Feinstein descrita en el texto. Se emplea ácido "H" en vez de ácido metantróico.

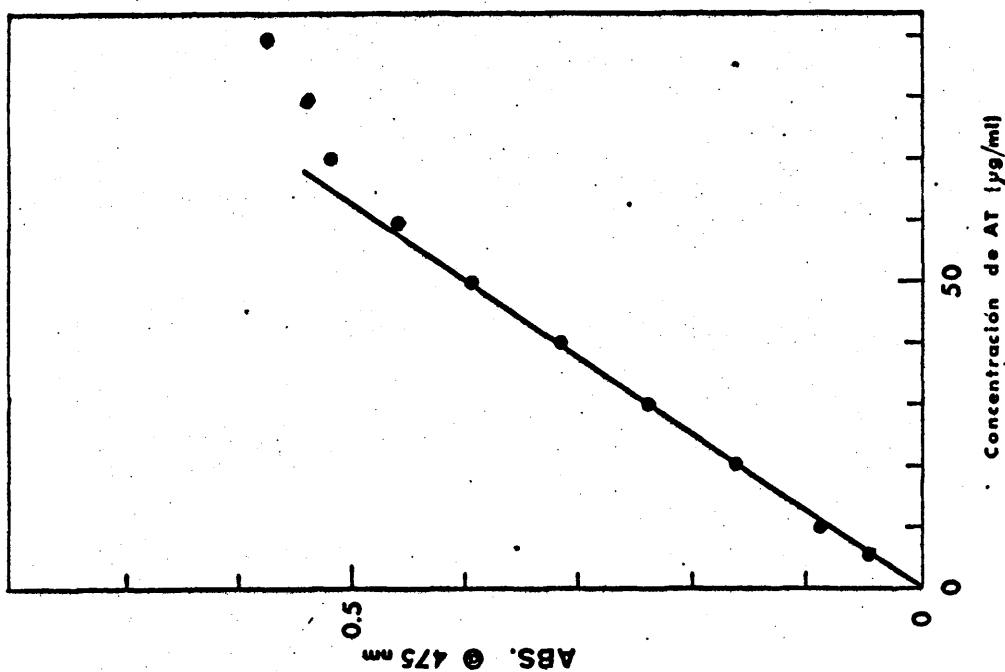


FIGURA 37.- Validez de la ley de Lambert-Beer en el intervalo 0-60 µg/ml de amitrol en la valoración de Green y Feinstein modificada.

(522) y revelada con reactivo de Ehrlich. El esquema de dicha cromatografía se ha recogido en la figura 38 en la que se puede apreciar que la eliminación del amitrol por vía urinaria es rápida, ya que aparece antes de las 24 horas de la primera inyección y no se detecta su presencia en la orina del día octavo, recogida entre 24 y 48 horas después de la administración de la última dosis.

La otra mancha intensa de R_f 0.48, que se encuentra en todas las muestras recogidas, da también reacción positiva con ninhidrina, pero no corresponde a ningún derivado de amitrol por cuanto se encuentra también en la orina de animales normales. En su momento se pudo comprobar que correspondía a urea.

Por otra parte, el tratamiento con amitrol produce un aumento del pH de la orina, según puede apreciarse en la tabla LIX. Este aumento no puede deberse a la presencia de amitrol en orina, puesto que el pH de la muestra correspondiente al segundo día, que ya contiene amitrol en cantidad notable, es todavía normal. Además, las disoluciones de amitrol, aún concentradas, tienen un pH muy próximo a la neutralidad, como cabe esperar del valor de su pI (7.71) calculado a partir de los datos de Schmidt y Gehlen (521).

TABLA LIX

pH DE LA ORINA DE RATAS TRATADAS CON AMITROL

<u>Día de tratamiento</u>	<u>pH</u>
2°	6.6
3°	8.9
4°	9.1
6°	8.7

Los demás estudios realizados con orina de animales pertenecientes a otras series de tratamientos arrojaron conclusiones similares a las expuestas en cuanto a la rápida eliminación del amitrol.

3.8.2.3. Investigación de derivados de amitrol en animales tratados.

Se han comentado en la primera parte de esta memoria los escasos datos que se encuentran en la bibliografía sobre el metabolismo de ami

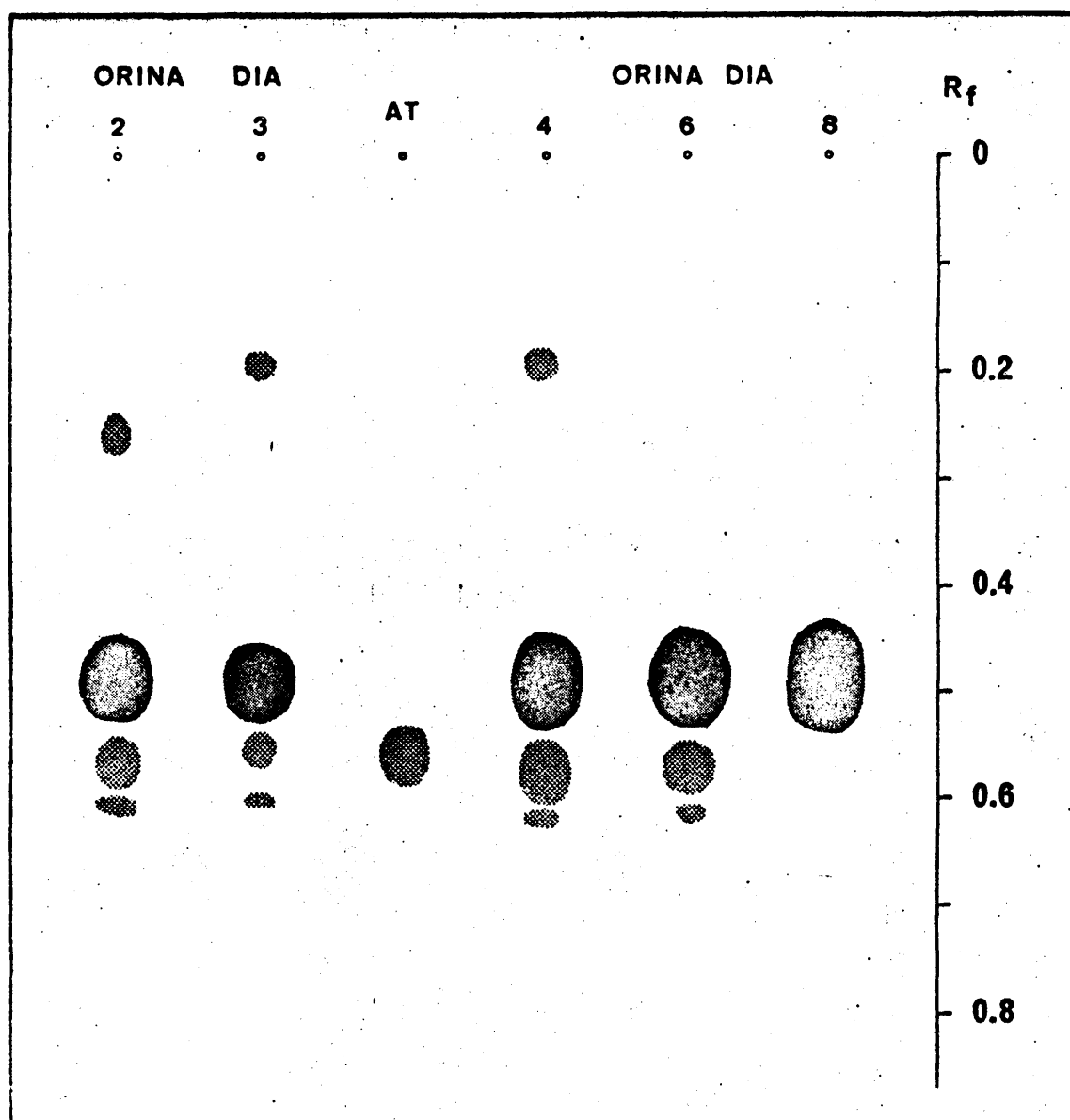


FIGURA 38.- Eliminación de amitrol por vía urinaria. Véanse en el texto los detalles de la experiencia.

trol en mamíferos. Cabe destacar en este momento las observaciones de Fang y col. (108) sobre la gran velocidad con que se metaboliza el amitrol en hígado.

Las experiencias realizadas en el curso de la presente investigación están de completo acuerdo con estos datos. Se ha investigado la presencia de amitrol o sus derivados en el hígado de todos los animales tratados de las series 1, 2 y 3 (véase 3.4.2) y en ningún caso se pudo detectar ninguno de ellos, ni mediante técnicas cromatográficas ni por los métodos de valoración descritos en el apartado 2.4.1.2.

Sin embargo, en la orina de los animales, preparada para su análisis por el método expuesto en 2.4.1.4, sí se pueden detectar metabolitos de amitrol mediante el empleo de técnicas cromatográficas adecuadas.

La orina purificada parcialmente se sometió a cromatografía ascendente en diversos sistemas de disolventes. En la tabla LX se indican las manchas que aparecieron al revelar los cromatogramas con reactivo "H".

TABLA LX

R_{AT} DE DERIVADOS DE AMITROL PRESENTES EN ORINA DE ANIMALES TRATADOS.

Disolvente	Manchas detectadas (*)			
	R_{AT}			
A	1.00 (i) AT	0.25 (m)	0.14 (m) ATala (0.09)	
B	1.00 (i) AT	0.85 (m) ATala (0.75)	0.69 (m) I(H-L) (0.65)	0.46 (d) X (R) (0.47)
C	1.00 (i) AT	0.78 (m) I(H-L) (0.55)	0.30 (d) X (R) (0.33)	0.26 (m) ATala (0.20)
D	1.00 (i) AT	0.44 (m) I(H-L)	0.30 (m) ATala (0.21)	0.07 (d) X(R)

(*) A continuación del R_{AT} de cada mancha se indica su abundancia relativa (i = intensa; m = media; d = débil) y debajo del R_{AT} se indica la asignación realizada para cada mancha y el R_{AT} descrito en la bibliografía (ATala = amitrolilalanina; I(H-L) = derivado I de Herrett y Linck; X(R) = X de Racusen.

En casi todos los casos aparecen tres manchas, además del amitrol; dos de ellas tienen una intensidad media, mientras que la tercera es débil. Los datos experimentales recogidos en la tabla LX permiten decidir las asignaciones que en la misma se incluyen. En el sistema A sólo se aprecian dos manchas de intensidad media en vez de tres, pero en la de R_f más alto pueden solaparse los dos derivados no asignados. Por otra parte, de los dos derivados más importantes de amitrol en orina, la amitrolilalanina es la presente en menor cantidad, al contrario de lo que ocurre como consecuencia del metabolismo de amitrol en alubias. Para completar estos estudios se realizó una nueva experiencia en la que se inyectó a los animales amitrol y glicocola en cantidades equimoleculares. Los derivados aislados de orina siguen siendo en este caso los mismos, pero sus proporciones relativas varían, ya que la mancha más intensa correspondía a amitrolilalanina, mientras que el derivado 2 y el propio amitrol se encontraban presentes en menor proporción. Estos nuevos resultados encajan perfectamente con los anteriores y sugieren que, también en mamíferos, la formación de amitrolilalanina tiene lugar a partir de glicocola.

Para comparar definitivamente los derivados del metabolismo de amitrol en ratas con los de vegetales y microorganismos, se realizó una cromatografía en capa fina de celulosa con el disolvente B de los extractos obtenidos de plantas, medio de cultivo de *E. coli* y orina, tanto de animales tratados con amitrol en la forma acostumbrada, como de los tratados con amitrol y glicocola.

La figura 39 recoge el resultado de revelar dicha cromatografía con reactivo "H". No se aprecia en ella la presencia del derivado 3 (X de Racusen) debido a que, para obtener buena resolución del resto de las zonas, se aplicaron los problemas a baja concentración. Puede observarse que, en cuanto a los dos derivados más importantes, el paralelismo entre las transformaciones del amitrol es completo, a pesar de la diferencia evolutiva que existe entre las especies investigadas. El esquema pone de manifiesto, además, las consecuencias, antes apuntadas, del tratamiento de los animales con mezclas de amitrol y glicocola.

3.8.2.4. Metabolismo del amitrol "in vitro".

Para completar la serie de investigaciones realizadas sobre el metabolismo de amitrol en ratas se realizó una experiencia final según la

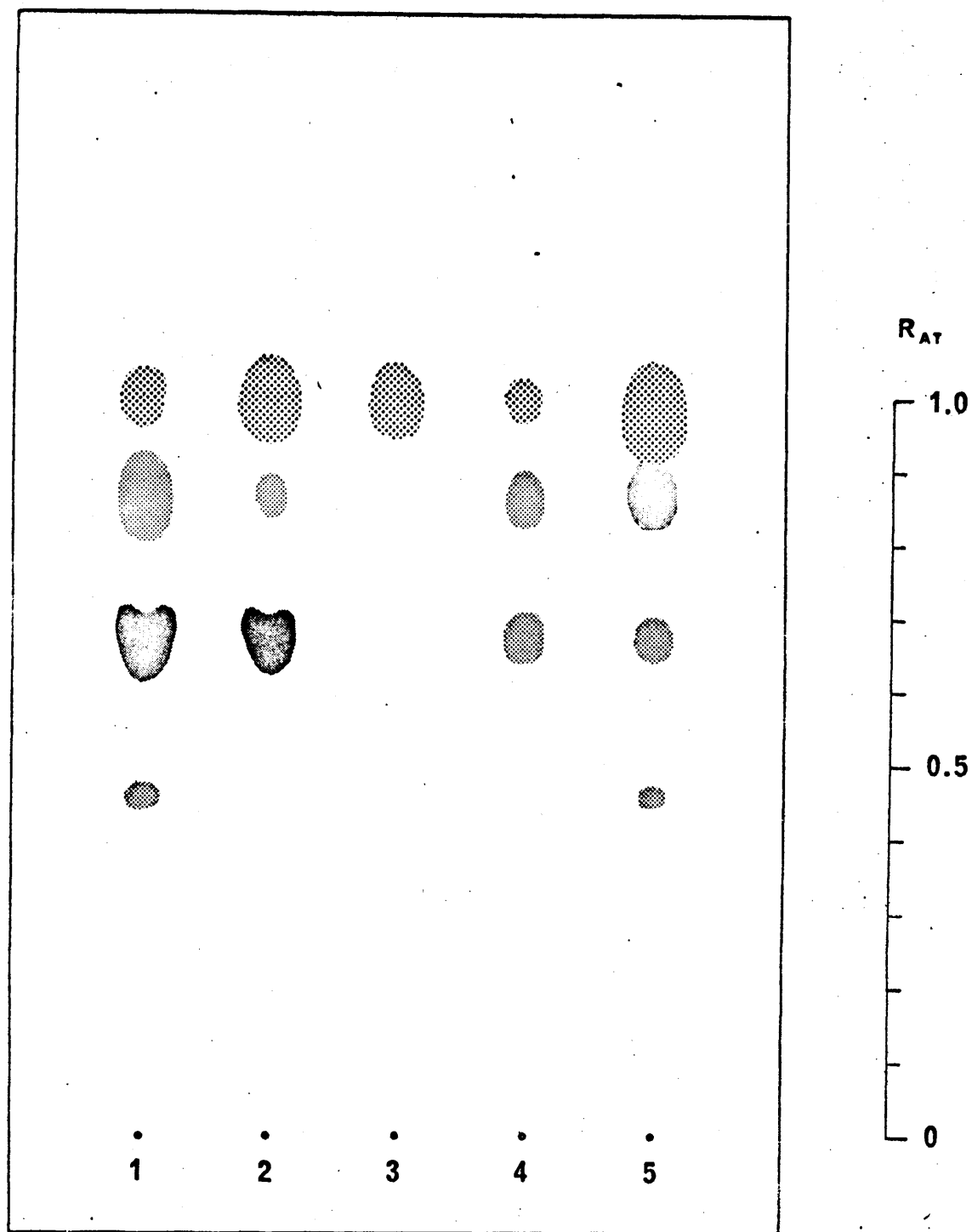


FIGURA 39.- Cromatografía ascendente de: 1) "Extracto I" de plantas tratadas con amitrol. 2) Medio de cultivo de E. coli 26-26 crecido en presencia de amitrol al 0.1%. 3) Amitrol. 4) Orina purificada de animales tratados con mezcla de amitrol y glicocola. 5) Id. de animales tratados sólo con amitrol.

técnica expuesta en el apartado 2.4.1.6. La separación cromatográfica se llevó a cabo con el disolvente A y después de revelar el cromatograma con reactivo "H" sólo se pudo poner de manifiesto la existencia de amitrol inalterado. Así pues, en las condiciones experimentales utilizadas, el amitrol no es capaz de metabolizarse "in vitro".

3.8.3. Discusión de los estudios de metabolismo de amitrol

El amitrol se metaboliza rápidamente en ratas para dar origen fundamentalmente a dos derivados, cuyo comportamiento cromatográfico coincide con el de los encontrados en otros organismos, amitrolilalanina y el derivado designado como 2 en la presente investigación. Este último no es sino el derivado I de Herrett y Linck, análogo, por otra parte, al Y de Racusen. Se origina también un tercer derivado, cuya proporción es menor, que puede identificarse con el X de Racusen aunque su reacción con ninhidrina no es apreciable.

Pero la formación de estos derivados no representa para los mamíferos la única vía de desintoxicación, ya que se elimina amitrol inalterado por orina en gran proporción. Por este motivo, sin duda, el tratamiento con amitrol no conduce a la desaparición de glicocola y serina como ocurre en vegetales, sino que simplemente da origen a una disminución relativa del nivel de serina en hígado - el tejido más activo en el metabolismo de amitrol (108)- por ser ese aminoácido uno de los sustratos más inmediatos para la formación de amitrolilalanina.

El hecho de que el amitrol no se transforme "in vitro" y lo haga activamente "in vivo" habla en favor de la inducción en este último caso de sistemas enzimáticos encargados de cooperar a la desintoxicación por transformación bioquímica del amitrol, inducción que ha sido descrita en numerosas ocasiones como consecuencia del tratamiento de animales con drogas tóxicas (523).

Quedan de esta manera completados los estudios sobre los efectos del amitrol en mamíferos, justificándose, con los descritos en las últimas secciones, las anomalías encontradas en el análisis de aminoácidos libres en la proporción relativa de glicocola y serina.

4. CONCLUSIONES

El objeto inicial del presente trabajo -estudio de la influencia del amitrol sobre la biosíntesis de proteínas en mamíferos- ha desembocado, después de investigaciones acerca de sus efectos en la incorporación de aminoácidos a proteínas en sistemas acelulares e "in vivo", en el estudio de los efectos del amitrol concomitantes con las alteraciones que causa sobre la biosíntesis de proteínas "in vivo". A tal fin se ha investigado su influencia sobre el contenido de ácidos nucleicos, lípidos, y aminoácidos libres y, finalmente, se ha estudiado el mecanismo de la eliminación y metabolismo del amitrol. A continuación se exponen las conclusiones obtenidas en el transcurso del trabajo.

1^a. El amitrol no altera, en un nivel importante, la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares. En su presencia no se observa inhibición alguna en los obtenidos de cerebro y de reticulocitos de conejo y sólo una ligera disminución (15 - 20 %) en sistemas aislados de hígado de cobaya. Las experiencias realizadas para localizar el modo de acción del amitrol en este último caso indican que la disminución en el nivel de incorporación de aminoácidos se debe a un retraso inicial en su activación. Este extremo se ha puesto de manifiesto mediante el empleo de una técnica original para el estudio de la primera fase de la biosíntesis de proteínas, basada en la determinación de la disminución de actividad de ATP- γ -³²P en presencia de pirofosfato normal.

2^a. Cuando, después de tratamientos cortos con amitrol, se inyecta a ratas leucina-¹⁴C la incorporación de este aminoácido en proteínas es superior a la normal en todos los tejidos estudiados (hígado, bazo y proteínas de suero). Las diferencias mayores se encuentran en proteínas de suero y este efecto es independiente de la cantidad de amitrol inyectado para dosis superiores a 1 g/Kg.

3^a. El tratamiento con amitrol durante periodos de tiempo superiores a 50 días provoca pérdida de peso de los animales que va acompañada por una reducción del tamaño del hígado. Si la duración del tratamiento es inferior el hígado es mayor de lo normal y, al mismo tiempo, puede presentarse una elevación del peso total de los animales.

4^a. Como consecuencia de tratamientos de duración media (55 días) se observa una disminución del nivel de DNA hepático que se atribuye a la carencia de sustratos para su biosíntesis. Estudios histológicos han revelado que esa disminución se traduce, a nivel celular, en la deformación o incluso ausencia total de núcleos en zonas concretas del parénquima hepático que exhiben marcada necrosis. La carencia de sustratos no es consecuencia de defectos de absorción, ya que el examen microscópico de la mucosa intestinal no revela anormalidades.

5^a. En paralelo con la disminución de DNA el amitrol provoca la del nivel de RNA y proteínas. La pérdida de estas últimas puede además justificarse por la inhibición de la biosíntesis de tiroxina que, en condiciones normales, estimula la síntesis de proteínas hepáticas y, por otra parte, puede relacionarse con la disminución de tamaño del hígado.

6^a. Se ha observado aumento en la concentración de aminoácidos libres en el hígado de los animales tratados con amitrol dato que puede interpretarse en concomitancia con la disminución del nivel de proteínas hepáticas. El análisis cuali y cuantitativo de aminoácidos libres permite, además, concluir que la disponibilidad de los que entran a formar parte de las proteínas es normal en todos los casos -al contrario de lo que ocurre en vegetales tratados con amitrol- y no puede, por tanto, justificar la menor cantidad de proteínas hepáticas.

7^a. Las diferencias más notables encontradas en el análisis de aminoácidos libres de animales normales y tratados con amitrol se encuentran en el contenido de taurina y sulfóxidos de metionina. Estos resultados apuntan hacia una interferencia del amitrol con el metabolismo de compuestos azufrados que no ha sido descrita hasta la fecha. Por otra parte, la relación entre las concentraciones de glicocola y serina aumenta en hígado después de la administración de amitrol..

8^a. Al cabo de largos tratamientos (más de 100 días) el amitrol provoca un ligero aumento en la cantidad de DNA hepático. Aunque no se ob-

servan metástasis ni alteraciones macroscópicas, este aumento se atribuye al comienzo de alteraciones neoplásicas que, conforme se ha descrito en la bibliografía, tienen lugar como consecuencia de la administración prolongada de amitrol.

9^a. El nivel de proteínas sigue siendo inferior al normal al cabo de tratamientos largos con amitrol. Este hecho, junto con el ligero aumento de DNA, parece indicar que la biosíntesis de proteínas continúa parcialmente inhibida, probablemente por carencia de tiroxina.

10^a. En todos los casos, y con independencia de la duración del tratamiento, se observa una disminución del nivel de lípidos en los animales inyectados con amitrol. Este descenso se puede interpretar en concomitancia con las alteraciones que, como se ha descrito en la bibliografía, provoca esa sustancia en el metabolismo de hidratos de carbono.

11^a. El análisis de las proteínas hepáticas no revela diferencias apreciables de composición entre las normales y las procedentes de animales tratados. Así pues, la mayor incorporación de leucina a proteínas "in vivo" después de tratamientos cortos puede atribuirse a un incremento inicial de su biosíntesis, relacionado con el aumento de tamaño del hígado.

Por otra parte, la disminución del nivel de proteínas experimentado por los animales sometidos a tratamientos medios o largos se interpreta como consecuencia de una acción intermedia e inespecífica a través del tiroides.

12^a. El análisis de proteínas de suero revela diferencias de composición pequeñas pero reproducibles y significativas después del tratamiento con amitrol. Consideradas en su conjunto, las proteínas de suero de animales tratados resultan ser más básicas ya que la relación entre aminoácidos básicos y ácidos es superior a la normal. El análisis electroforético de esas proteínas permite detectar que el tratamiento con amitrol va acompañado por un incremento en el nivel de γ -globulinas -caso frecuente en procesos de intoxicación- que da cuenta de la mayor basicidad del conjunto de las proteínas de suero.

13^a. En el análisis de aminoácidos libres en suero se puede detectar también una variación en la relación de concentraciones de glicocola y serina. Este dato, junto con los obtenidos en el análisis de aminoácidos libres hepáticos sugiere una acción del amitrol sobre el equilibrio glicocola - serina.

14^a. La presencia de amitrol no modifica la biosíntesis "in vitro" de serina a partir de glicocola. Su administración a ratas tampoco reduce la actividad ni el nivel total en hígado de serina hidroximetiltransferasa. Las diferencias en la relación glicocola/serina no se deben por tanto a alteraciones en la interconversión de estos aminoácidos.

15^a. Todas las conclusiones establecidas anteriormente indican que el amitrol presenta frente a mamíferos una toxicidad que, aunque poco intensa, es compleja y perfectamente definida y compleja.

16^a. El amitrol se elimina rápidamente de los animales tratados por vía urinaria; antes de las 24 horas de su administración ya se detecta en cantidad apreciable. Simultáneamente se puede observar una elevación del pH de la orina que no se debe a la simple presencia de amitrol.

17^a. Además de amitrol inalterado se pueden detectar en la orina de animales tratados dos metabolitos en cantidad relativamente importante y un tercero en proporción muy escasa. Los dos más abundantes se han identificado por técnicas cromatográficas con el ATX de Massini y el derivado I de Herrett y Linck. El menos abundante puede ser idéntico al derivado X de Racusen. Las identificaciones se han establecido por comparación, después de aislar los derivados correspondientes a partir de vegetales tratados con amitrol y microorganismos crecidos en presencia de dicha sustancia.

18^a. En el transcurso de las identificaciones descritas en la conclusión anterior se han obtenido nuevos datos que constituyen un apoyo adicional a la estructura de amitrolilalanina propuesta por Massini para el ATX. Para ello se ha hecho uso de la espectroscopía infrarroja y de un estudio semicuantitativo del comportamiento del ATX en un analizador automático de aminoácidos.

19^a. El consumo de serina destinado a la biosíntesis de amitrolilalanina puede ser la causa de las variaciones observadas en la relación glicocola/serina que, como se ha indicado anteriormente, no pueden deberse a alteraciones en la interconversión de estos aminoácidos. En este sentido, aunque de modo indirecto, apuntan las experiencias realizadas al inyectar simultáneamente a los animales amitrol y glicocola.

20^a. El amitrol no es capaz de metabolizarse "in vitro" cuando se añade a un homogeneizado de hígado de rata. Este dato, junto con el de su rápida transformación "in vivo", parece indicar que esta última tiene lugar después de un proceso de inducción de los sistemas enzimáticos responsables de la biosíntesis de sus derivados.

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) J. Thiele y M. Manchot; *Liebigs Ann.*, 303, 45 (1898).
- (2) W.C. Hall, S.P. Johnson y C.L. Leinweber; *Bull. Texas Agr. Expt. Sta.*, No 789 (1954).
- (3) E.K. Woodford, K. Holly y C.C. McCready; *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 9, 311 (1958).
- (4) A.S. Crafts y S. Yamaguchi; *Hilgardia*, 27, 421 (1958).
- (5) P. Massini; *Acta Bot. Neerl.*, 10, 99 (1961).
- (6) O. Andersen; *Weeds*, 6, 370 (1958).
- (7) D. Racusen; *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 106 (1958).
- (8) M.C. Carter y A.W. Naylor; *Bot. Gaz.*, 122, 138 (1960).
- (9) R.A. Herret y A.J. Linck; *Physiol. Plantarum*, 14, 767 (1961).
- (10) J.E. Yost y E.F. Williams; *Proc. Northeast Weed Control Conf.* 12th meeting, pg. 9. N. York, 1958.
- (11) P. Massini; *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 548 (1959).
- (12) M.C. Carter y A.W. Naylor; *Physiol. Plantarum*, 14, 20 (1961).
- (13) C.S. Miller y W.C. Hall; *J. Agr. Food Chem.*, 9, 210 (1961).
- (14) M.C. Carter y A.W. Naylor; *Physiol. Plantarum*, 14, 62 (1961).
- (15) J.L. Hilton, L.L. Jansen y H.M. Hull; *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 14, 353 (1963).
- (16) P. Massini; *Acta Bot. Neerl.*, 12, 64 (1963).
- (17) R.A. Herret y W.P. Bagley; *J. Agr. Food Chem.*, 12, 17 (1964).
- (18) P. Massini; *Acta Bot. Neerl.*, 7, 524 (1958).
- (19) B.J. Rogers; "The Hormolog". Amchem Products Inc., Ambler, 1957.
- (20) A.C. Gentile y J.F. Fredrick; *Physiol. Plantarum*, 12, 862 (1959).
- (21) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; *Phyton*, 15, 1 (1960).
- (22) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; *Arch. Biochem. Biophys.*, 92, 356 (1961).

- (23) R.H. Shimabukuru y A.J. Linck; *Physiol. Plantarum*, 17, 100 (1964).
- (24) B.J. Rogers; *Plant Physiol.*, 32, suppl. VI (1957).
- (25) W.B. Ennis; *Proc. Southern Weed Conf. 9th meeting.* pg. 71. N. Orleans, 1956.
- (26) W.G. Heim, D. Appleman y H.T. Pyfrom; *Science*, 122, 693 (1955).
- (27) K. Nomiya; *Med. J. Shinshu Univ.*, 7, 27 (1962); *Chem. Abs.*, 58, 1824c (1962).
- (28) M.T. Hirokawa; *Arch. Maladies Profess. Med. Trav. Sécurité Sociale*, 21, 46 (1960).
- (29) H.T. Pyfrom, D. Appleman y W.G. Heim; *Plant. Physiol.*, 32, 674 (1957).
- (30) W.G. Heim, D. Appleman y H.T. Pyfrom; *Am. J. Physiol.*, 186, 19 (1956).
- (31) R.N. Feinstein, S. Berliner y F.O. Green; *Arch. Biochem. Biophys.*, 76, 32 (1958).
- (32) R.D. Palmer y W.K. Porter; *Weeds*, 7, 511 (1959).
- (33) S. Aaronson; *J. Protozool.*, 7, 289 (1960).
- (34) V.H. Auerbach, Pieringer y R.A. Waisman; *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 370 (1959).
- (35) L. Bogorad; *J. Biol. Chem.*, 233, 501 (1958).
- (36) L. Bogorad; *J. Biol. Chem.*, 233, 510 (1958).
- (37) F.T. Wolf; *Nature*, 188, 164 (1960).
- (38) T. Guillot-Salomon, M. Signol y R. Duce; *Compt. Rend. Ser. D*, 263, 264 (1966).
- (39) S. Aaronson y S. Scher; *J. Protozool.*, 7, 156 (1960).
- (40) J.L. Hilton; *Weeds*, 8, 392 (1960).
- (41) J.L. Hilton; *Plant. Physiol.*, 37, 238 (1962).
- (42) L.S. Jordan, T. Murashige, J.D. Mann y B.E. Day; *Weeds*, 14, 134 (1966).
- (43) L. Eliasson; *Physiol. Plantarum*, 15, 229 (1962).
- (44) Y. Menoret y J. Tracez; *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 244, 2827 (1957).
- (45) P.A. Castelfranco; *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 485 (1960).
- (46) K.A. Sund; *J. Agr. Food Chem.*, 4, 57 (1956).
- (47) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; *Arch. Biochem. Biophys.*, 86, 30 (1960).
- (48) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; *Arch. Biochem. Biophys.*, 91, 178 (1960).

- (49) O. Makovcova; Meded. Rijksfac. Landbouwwetensh., Gent. 32, 1036 (1967).
- (50) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; Physiol. Plantarum, 13, 761 (1960).
- (51) A.W. Naylor; J. Agr. Food Chem., 12, 21 (1964).
- (52) J.F. Fredrick; Phytochem., 2, 413 (1963).
- (53) J.F. Fredrick; Physiol. Plantarum, 16, 822 (1963).
- (54) J.F. Fredrick; Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 634 (1964).
- (55) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; Ann. N. Y. Acad. Sci., 144, 362 (1967).
- (56) C.G. McWhorter y W.K. Porter; Physiol. Plantarum, 13, 444 (1960).
- (57) C.G. McWhorter; Physiol. Plantarum, 16, 31 (1963).
- (58) P. Castelfranco y T. Bisalputra; Am. J. Botany, 52, 222 (1955).
- (59) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; Physiol. Plantarum, 15, 186 (1962).
- (60) J.B. Bourke, J.S. Butts y S.C. Fang; Weeds, 12, 272 (1964).
- (61) J.F. Fredrick; Phyton, 22, 67 (1965).
- (62) J.F. Fredrick y A.C. Gentile; Phytochem., 4, 851 (1966).
- (63) A.K. Williams, S.T. Cox y R.G. Eagon; Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 250 (1965).
- (64) S.C. Fang, E. Fallin y S. Khanna; Weeds, 14, 343 (1967).
- (65) F.W. Weyter y H. Broquist; Biochim. Biophys. Acta, 40, 567 (1960).
- (66) T.J. Bond y J. Akers; J. Bacteriol., 81, 327 (1961).
- (67) T. Klopotoski y G. Bagdasarian; Acta Biochim. Polon., 13, 133 (1966).
- (68) P.J. Casselton; Nature, 204, 93 (1964).
- (69) J.N. Siegel y A.C. Gentile; Plant Physiol., 41, 670 (1966).
- (70) F.T. Wolf; Plant Physiol., 36, suppl. XXXIX (1961).
- (71) F.T. Wolf; Nature, 193, 901 (1962).
- (72) A.D. Boney; J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 43, 643 (1963).
- (73) P.J. Casselton; Physiol. Plantarum, 19, 411 (1966).
- (74) W.T. Jackson; Weeds, 9, 437 (1961).
- (75) K.A. Sund, E.C. Putala y H.N. Little; J. Agr. Food Chem., 8, 210 (1960).
- (76) F.D. Aldrich; Abstr. 1958 Metting Weed Soc. Amer., pg. 32 (1958).
- (77) K.A. Sund y H.N. Little; Science, 132, 622 (1960).

- (78) C. Mitoma y E.E. Snell; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 41, 891 (1955).
- (79) J. Bacteriol., 63, 233 (1952).
- (80) T. Kłopotowski y D. Hulanicka; Acta Biochim. Polon., 10, 209 (1963).
- (81) T. Kłopotowski y D. Hulanicka; Acta Biochim. Polon., 10, 199 (1963).
- (82) J.L. Hilton y P.C. Kearney; Weeds, 13, 22 (1965).
- (83) J.L. Hilton, P.C. Kearney y B.N. Ames; Arch. Biochem. Biophys., 112, 544 (1965).
- (84) T. Kłopotowski y A. Wiater; Arch. Biochem. Biophys., 112, 562 (1965).
- (85) C.G. McWhorter y J.L. Hilton; Physiol. Plantarum, 20, 30 (1967).
- (86) P.J. Casselton; Can. J. Microbiol., 13, 1564 (1967).
- (87) J.C. Rabinowitz y W.E. Pricer; J. Biol. Chem., 222, 537 (1956).
- (88) E.E. Schweizer y B.J. Rogers; Weeds, 12, 310 (1964).
- (89) P.G. Bertels y F.T. Wolf; Physiol. Plantarum, 18, 805 (1965).
- (90) E. Guérin-Dumartrait y M. Straub; Bull. Soc. Franç. Physiol. Végétale, 11, 273 (1965).
- (91) D.J. Worth y B.C. Longman; Can. J. Botany, 39, 339 (1961).
- (92) E. Guérin-Dumartrait; Physiol. Végétale, 4, 135 (1966).
- (93) J. van Overbeek en "The Physiology and Biochemistry of Herbicides" (ed. L.J. Andus). Academic Press, New York, 1964.
- (94) J.D. Mann; Plant Physiol., 40, 840 (1965).
- (95) W.F. Durham; Public Health Lab. Reports, 19, 47 (1961).
- (96) K. Nomiyama, M. Minai y H. Kita; Bull. Tokyo Med. Dental Univ., 12, 55 (1965).
- (97) E. Kröllner; Residue Rev., 12, 162 (1966).
- (98) N.M. Demidenko; Gigiena i Toksikol. Novij Pestitsidov i Klinika Otravlenii, Dokl. 2Vses. Konf., 1962, 376; vd. Chem. Abs., 60, 11259g.
- (99) M. Hoshino; Nature, 186, 174 (1960).
- (100) F. Lundquist, I. Svendsen y P.H. Petresen; Biochem. J., 86, 119 (1963).
- (101) M. Rechcigl y W.H. Evans; Nature, 199, 1001 (1963).
- (102) T.H. Jukes y C.B. Shaffer; Science, 132, 296 (1960).
- (103) N.M. Alexander; J. Biol. Chem., 234, 148 (1959).
- (104) G. N. Napalkov; Gigiena Truda i Prof. Zaboлевaniya, 6, 48 (1962).

- (105) H.G. Hodge, E.A. Maynard, W.L. Downs, J.K. Ashton y L.L. Salerno; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 9, 583 (1966).
- (106) A. Lacassagne, A.J. Rosenberg, N.D. Xuong y L. Hurst; *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 265, 646 (1967).
- (107) B. Oser; *Residue Rev.* 1, 6 (1962).
- (108) S.C. Fang, M. George y T. Chang-Yu; *J. Agr. Food Chem.*, 12, 219 (1964).
- (109) T. Caspersson; *Naturwissenschaften*, 29, 33 (1941).
- (110) J. Brachet; *Arch. Biol. (Liège)*, 53, 206 (1942).
- (111) E.B. Keller, P.C. Zamecnik y R.B. Loftfield; *J. Histochem.*, 2, 376 (1954).
- (112) J.W. Littlefield, E.B. Keller, J. Gros y P.C. Zamecnik; *J. Biol. Chem.*, 217, 111 (1955).
- (113) G.E. Palade y P. Siekevitz; *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 171 (1956).
- (114) P.N. Campbell, C. Cooper y M. Hicks; *Biochem. J.*, 92, 225 (1964).
- (115) T. Peters; *J. Biol. Chem.*, 237, 1186 (1962).
- (116) H.E. Huxley y G. Zubay; *J. Mol. Biol.*, 2, 10 (1960).
- (117) F.C. Chao; *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 426 (1957).
- (118) M.L. Peterman; "The Physical and Chemical Properties of Ribosomes". Elsevier, New York, (1965).
- (119) C.G. Kurland; *J. Mol. Biol.*, 2, 83 (1960). S.T. Bayley; *J. Mol. Biol.*, 8, 231 (1964).
- (120) A. Tissieres, J.D. Watson, D. Schlessinger y B.R. Hollingworth; *J. Mol. Biol.*, 1, 221 (1959).
- (121) D. Elson en "New Perspectives in Biology", (ed. M. Sela), vol. 4, pg. 92. B.B.A. Library, Elsevier, Amsterdam (1964).
- (122) R.K. Datta, D. Bhattacharyya y J.J. Ghosh; *J. Neurochem.*, 11, 87 (1964).
- (123) D. Elson; *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 372 (1959).
- (124) M. Tal y D. Elson; *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 40 (1963).
- (125) R.K. Datta y J.J. Ghosh; *J. Neurochem.*, 11, 779 (1964).
- (126) R.K. Datta y J.J. Ghosh; *J. Neurochem.*, 10, 285 (1963).
- (127) K.S. Kirby en "Techniques in Protein Biosynthesis", P.N. Campbell y J.R. Sargent (eds.); vol. I pg. 265, Academic Press, London, (1967).
- (128) R. Monier, S. Naono, D. Hayes, F. Hayes y F. Gros; *J. Mol. Biol.*, 6, 311 (1962).
- (129) K.S. Kirby, J.R.B. Hastings y J.H. Parish en "Subcellular components: preparation and fractionation", G.D. Birnie y S.M. Fox, pg. 117. Butterworths, London, (1969).

- (130) G. Beck, J. Duval, G. Aubel-Sadron y J.P. Ebel; Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 1205 (1966).
- (131) A.S. Spirin en J.N. Davidson y W.E. Cohn (eds.); "Progress in Nucleic Acid Research", vol. I, pg. 301. Academic Press, New York, (1963).
- (132) J. Marcot-Queiroz, J. Julien, R. Roset y R. Monier; Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 183 (1965).
- (133) J.H. Parish y K.S. Kirby; J. Mol. Biol., 22, 393 (1966).
- (134) G.G. Brownlee, F. Sanger y B.G. Barrell; Nature, 215, 735 (1967).
- (135) B.G. Forget y S.M. Weissman; Science, 158, 1965 (1967).
- (136) R. Roset, R. Monier y J. Julien; Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 87 (1964).
- (137) C.F. Crampton y M.L. Peterman; J. Biol. Chem. 234, 2642 (1959).
- (138) T.S. Work; J. Mol. Biol., 10, 544 (1964).
- (139) J.P. Waller y J.I. Harris; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47, 18 (1961).
- (140) J.P. Waller; J. Mol. Biol., 10, 319 (1964).
- (141) P. Traub, M. Nomura y L. Tu; J. Mol. Biol., 19, 215 (1966).
- (142) P.F. Spahr; J. Mol. Biol., 4, 395 (1962).
- (143) P.S. Leboy, E.C. Cox y J.G. Flaks; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 1367 (1964).
- (144) M. Meselson, M. Nomura, S. Brenner, C. Davern y D. Schlessinger; J. Mol. Biol., 9, 696 (1964).
- (145) M.I. Lerman, A.S. Spirin, L.P. Gavrilova y V.F. Golov; J. Mol. Biol., 15, 268 (1966).
- (146) K. Hosokawa, R.K. Fujimura y M. Nomura; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 198 (1966).
- (147) T.Y. Wang; Biochim. Biophys. Acta, 51, 180 (1961).
- (148) A.O. Pogo. B.G.T. Pogo, V.C. Littau, V.G. Allfrey, A.E. Mirsky y M.G. Hamilton; Biochim. Biophys. Acta, 55, 849 (1962).
- (149) R. Rendi, Exptl. Cell Res., 17, 585 (1959).
- (150) N.M. Sisakyan; Rev. Roumaine Biochim., 3, 131 (1966).
- (151) S. Biswas y B.B. Biswas; Indian J. Biochem, 3, 96 (1966).
- (152) J.M. Eisenstadt en "Biochemistry of chloroplasts" (ed. T.W. Goodwin) vol. II, pg. 341. Academic Press, London-New York, 1967.
- (153) D.D. Sabatini, Y. Tashiro y G.E. Palade; J. Mol. Biol., 19, 503 (1966).
- (154) J.R. Warner. A. Rich y C.E. Hall; Science, 138, 1399 (1962).

- (155) A. Gierer; J. Mol. Biol., 6, 148 (1963).
- (156) J.R. Warner, P.M. Knopf y A. Rich; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 122 (1963).
- (157) H. Noll, T. Staehelin y F.O. Wettstein; Nature, 198, 632 (1963).
- (158) T. Staehelin, C.C. Britton, F.O. Wettstein y H. Noll; Nature, 199, 865 (1963).
- (159) M.J. Becker y A. Rich; Nature, 212, 142 (1966).
- (160) S. Penman, K. Scherrer, Y. Becker y J.E. Darnell; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 654 (1963).
- (161) E. Shelton y E.L. Kuff; J. Mol. Biol., 22, 23 (1966).
- (162) H.R.V. Arnstein en "Subcellular components: preparation and fractionation" (eds. G.D. Birnie y S.M. Fox) pg. 109. Butterworths, London, 1969.
- (163) K.G. Nair, R. Zak y M. Rabinowitz; Biochemistry, 5, 2674 (1966).
- (164) A. Novikoff, E. Essner y N. Quintana; Fed. Proc., 23, 1010 (1964).
- (165) A. Niklas, E. Quincke, W. Maurer y H. Neyer; Biochem. Z., 330, 1 (1958); E. Hansson; Acta Physiol. Scand., 46, suppl. 161 (1959).
- (166) H. Hyden; Acta Physiol. Scand., 6, suppl. 17 (1943).
- (167) S.L. Palay y G.E. Palade; J. Biophys. Biochem. Cytol., 1, 69 (1955).
- (168) A. Inouye, Y. Shinagawa, S. Masumura, S. Hori, A. Irimiziri y S. Yahara; J. Electron Microscopy, 13, 113 (1966).
- (169) C.E. Zomzely, S. Roberts, D.M. Brown y C. Provost; J. Mol. Biol., 20, 455 (1966).
- (170) P.C. Zamecnik y E.B. Keller; J. Biol. Chem., 209, 337 (1954).
- (171) M.B. Hoagland, E.B. Keller y P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem., 218, 345 (1956).
- (172) M.B. Hoagland, M.L. Stephenson, J.F. Scott, L.I. Hecht y P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem., 231, 241 (1958).
- (173) A. von der Decken en "Techniques in Protein Biosynthesis" (eds. P.N. Campbell y J.R. Sargent), vol. I, pg. 65. Academic Press, London, 1967.
- (174) G.H. Hogeboom, W.C. Schneider y G.E. Palade; J. Biol. Chem., 172, 619 (1948).
- (175) H. Borsook, E.H. Fisher y G. Keighley; J. Biol. Chem., 229, 1059 (1957).
- (176) J. Kruh y H. Borsook; J. Biol. Chem., 220, 905 (1956).
- (177) H.R. Mahler y E.H. Cordes; "Biological Chemistry", pg. 201. Harper Intern. Ed., 1966.

- (178) W.P. Jencks, S. Cordes y J. Carriuolo; J. Biol. Chem., 235, 3608 (1960).
- (179) M.B. Hoagland; Biochim. Biophys. Acta, 16, 288 (1955).
- (180) M.B. Hoagland, E.B. Keller y P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem., 221, 45 (1956).
- (181) P. Berg; J. Biol. Chem., 222, 1025 (1956).
- (182) G.D. Novelli; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 86 (1958).
- (183) M.B. Hoagland, P.C. Zamecnik y M.L. Stephenson; Biochim. Biophys. Acta, 24, 215 (1957).
- (184) K. Ogata, H. Nohara y T. Marita; Biochim. Biophys. Acta, 26, 657 (1957).
- (185) R.W. Holley; J. Am. Chem. Soc., 79, 658 (1957).
- (186) P. Berg; Ann. Rev. Biochem., 30, 293 (1961).
- (187) H.S. Kingdon, L.T. Webster y E.W. Davie; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 757 (1958).
- (188) P.R. Krishnaswamy y A. Meister; J. Biol. Chem., 235, 408 (1960).
- (189) L.T. Webster y E.W. Davie; J. Biol. Chem., 236, 479 (1961).
- (190) P. Berg; J. Biol. Chem., 233, 601 (1958).
- (191) G.K. Wong y K. Moldave; J. Biol. Chem., 235, 694 (1960).
- (192) J. Preiss, P. Berg, E.J. Ofengand, F.H. Bergmann y M. Dieckmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 45, 319 (1959).
- (193) H.G. Zachau, G. Acs y F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 885 (1958).
- (194) P. Berg y E.J. Ofengand; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 78 (1958).
- (195) U. Lagerkvist y J. Waldenstrom; J. Mol. Biol., 8, 28 (1964).
- (196) M.P. Stulberg y G.D. Novelli en "The Enzymes" (eds. P.D. Boyer y K. Myrback), vol. 6, pg. 401. Academic Press, N. York y London, 1962.
- (197) G.D. Novelli; Ann. Rev. Biochem., 36, 449 (1967).
- (198) K.H. Muench y P. Berg en "Procedures in Nucleic Acid Research" (eds. G.L. Cantoni y D.R. Davis), pg. 375. Harper & Row. N. York, 1966.
- (199) A.N. Baldwin y P. Berg; J. Biol. Chem., 241, 831 (1966).
- (200) U. Lagerkvist y J. Waldenstrom; J. Biol. Chem., 240, 2264 (1965).
- (201) R. Calender y P. Berg; Biochemistry, 5, 1681 (1966).
- (202) M.P. Stulberg; J. Biol. Chem., 242, 1060 (1967).
- (203) M.H. Makman y G.L. Cantoni; Biochemistry, 4, 1434 (1965).
- (204) R. Calender y P. Berg; Biochemistry, 5, 1690 (1966).

- (205) K. Randerath, C.M. Janeway, M.L. Stephenson y P.C. Zamecnik; Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 98 (1966).
- (206) S.K. Mitra y A.H. Mehler; Eur. J. Biochem., 9, 79 (1969).
- (207) F.H. Bergmann, P. Berg y M. Dieckmann; J. Biol. Chem., 236, 1735 (1961).
- (208) P. Berg, F.H. Bergmann, E.J. Ofengand y M. Dieckmann; J. Biol. Chem., 236, 1726 (1961).
- (209) L. Yu Frolova y L.L. Kiselev; Biokhimiya, 28, 722 (1963).
- (210) W. Zillig, D. Schachtschabel y W. Krone; Z. Physiol. Chem., 318, 100 (1960).
- (211) A. Tissières; J. Mol. Biol., 1, 365 (1959).
- (212) S.B. Weiss, G. Acs y P. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 189 (1958).
- (213) R.W. Holley, J. Apgar, B.P. Doctor, J. Farrow, M.A. Marini y S.H. Merrill; J. Biol. Chem., 236, 200 (1961).
- (214) S. Osawa; Biochim. Biophys. Acta, 43, 110 (1960).
- (215) G. Dirheimer, J.H. Weil y J.P. Ebel; C.R. Acad. Sci. (Paris), 255, 2312 (1962).
- (216) R.C. Warner y P. Vaimberg; Fed. Proc., 17, 331 (1958).
- (217) R.W. Holley y S.H. Merrill; J. Am. Chem. Soc., 81, 753 (1959).
- (218) R.W. Holley, B.P. Doctor, S.H. Merrill y F.M. Saad; Biochim. Biophys. Acta, 35, 272 (1959).
- (219) B.P. Doctor, J. Apgar y R.W. Holley; J. Biol. Chem., 236, 1117 (1961).
- (220) J.R. Apgar, R.W. Holley y S.H. Merrill; J. Biol. Chem., 237, 796 (1962).
- (221) A. Armstrong, H. Hagopian, V.M. Ingram, I. Sjöquist y J. Sjöquist; Biochemistry, 3, 1194 (1964).
- (222) R.M. Hosquinson y H.G. Khorana; J. Biol. Chem., 240, 2129 (1965).
- (223) H.G. Zachau, M. Tada, W.B. Lawson y M. Schweiger; Biochim. Biophys. Acta, 53, 221 (1961).
- (224) W. Karau y H.G. Zachau; Biochim. Biophys. Acta, 91, 549 (1964).
- (225) R.W. Holley, J. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison, S.H. Merrill y A. Zamir; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 117 (1963).
- (226) J. Apgar y R.W. Holley; Biochem. Biophys. Res. Commun., 8, 391 (1962).
- (227) B. Weisblum, S. Benzer y R.W. Holley; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48, 1449 (1962).
- (228) G. von Ehrenstein y D. Dais; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,

- 50, 81 (1963).
- (229) B. Weisblum, F. Gonano, G. von Ehrenstein y S. Benzer; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 328 (1965).
- (230) U.L. RajBhandary y A. Stuart; Ann. Rev. Biochem., 35, 759 (1966).
- (231) D. Dutting, W. Karau, F. Melchers y H.G. Zachau; Biochim. Biophys. Acta, 108, 194 (1964).
- (232) G.A. Everett, S.H. Merrill y R.W. Holley; J. Am. Chem. Soc., 82, 5757 (1960).
- (233) R. Rösenthaller y P. Fromageot; J. Mol. Biol., 11, 458 (1965).
- (234) K. Nishiyama, T. Okamoto, I. Watanabe y M. Takanami; Biochim. Biophys. Acta, 47, 193 (1961).
- (235) Y. Kawade, T. Okamoto y Y. Yamamoto; Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 200 (1963).
- (236) M.L. Stephenson y P.C. Zamecnik; Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 91 (1962).
- (237) J.D. Mandell y A.D. Hershey; Anal. Biochem., 1, 66 (1960).
- (238) T. Okamoto y Y. Kawade; Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 324 (1963).
- (239) J. Cerná, I. Rychlík y F. Sorm; Coll. Czech. Chem. Commun., 31, 336 (1966).
- (240) M. Miyazaki, M. Kawata, K. Nakazawa y S. Takemura; J. Biochem. (Tokio), 62, 161 (1967).
- (241) B.C. Baguley, P.L. Bergquist y R.K. Ralph; Biochim. Biophys. Acta, 95, 510 (1965).
- (242) G.N. Zaitseva, R.N. Glebov, L.O. Matveeva, L.A. Khoika y A. N. Belozerskii; Biokhimiya, 31, 740 (1966).
- (243) P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson y J.F. Scott; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46, 811 (1960); R. Monier, M.L. Stephenson y P.C. Zamecnik; Biochim. Biophys. Acta, 43, 1 (1960); P.C. Zamecnik; Proc. Robert A. Welch, Found Conf. Chem. Res., 4-6, 161 (1961).
- (244) G. Zubay; J. Mol. Biol., 4, 347 (1962).
- (245) A.H. Mehler y A. Bank; J. Biol. Chem., 238, 2888 (1963).
- (246) S. Simon, U.Z. Littauer y E. Katchalski; Biochim. Biophys. Acta, 80, 169 (1964).
- (247) E. Katchalski, S. Yankofsky, A. Novogrodsky, Y. Galanter y U.Z. Littauer; Biochim. Biophys. Acta, 123, 641 (1966).
- (248) L.I. Hecht, P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson y J.F. Scott; J. Biol. Chem., 233, 954 (1958).
- (249) S. Osawa; Biochim. Biophys. Acta, 42, 244 (1960).

- (250) J.R. Apgar, G.A. Everett y R.W. Holley; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 546 (1965).
- (251) R.W. Holley, G.A. Everett, J.T. Madison y A. Zamir; J. Biol. Chem., 240, 2122 (1965).
- (252) R.W. Holley, J.R. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison, M. Marquisee, S.H. Merrill, J.R. Penswick y A. Zamir; Science, 147, 1462 (1965).
- (253) H.G. Zachau, D. Dutting y H. Feldman; Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 5, 422 (1966).
- (254) J.T. Madison, G. A. Everett y H.K. Kung; Science, 153, 531 (1966).
- (255) U.I. RajBhandary, A. Stuart, R.D. Faulkner, S.H. Chang y H.G. Khorana; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 425 (1966).
- (256) A.A. Baiev, T.V. Venkstern, A.D. Mirdsabekov, A.I. Krutilina; L. Li y V.D. Axelrod; Molek. Biologiya, 1, 754 (1967).
- (257) S. Takemura, T. Mizutani y M. Miyazaki; J. Biochem. (Tokyo), 63, 277 (1968);
- (258) S. Takemura, M. Murakami y M. Miyazaki; J. Biochem. (Tokyo), 65, 489 (1969).
- (259) S. Hashimoto, M. Miyazaki y S. Takemura; J. Biochem. (Tokyo), 65, 659 (1969).
- (260) H.M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner y J.D. Smith; Nature, 217, 1019 (1968).
- (261) S.K. Dube, K.A. Marcker, B.F.C. Clark y S. Cory; Eur. J. Biochem., 8, 256 (1969).
- (262) G. Katz y B. Dudock; J. Biol. Chem., 244, 3062 (1969); B. Dudock y G. Katz; *ibid.*, 244, 3069 (1969).
- (263) M. Staehelin, H. Rogg, B.C. Baguley, T. Ginsberg y W. Wehrli; Nature, 219, 1363 (1968).
- (264) M. Uziel y H.G. Gassen; Biochemistry, 8, 1643 (1969); M. Uziel y J.X. Khym; *ibid.*, 8, 3254 (1969).
- (265) F. Harada, F. Kimura y S. Nishimura; Biochim. Biophys. Acta, 182, 590 (1969).
- (266) J.P. Ebel; Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 2255 (1968).
- (267) G.L. Brown y G. Zubay; J. Mol. Biol., 2, 287 (1960).
- (268) R.A. Cox y U.Z. Littauer; J. Mol. Biol., 2, 167 (1960).
- (269) F.H.C. Crick; Symposia Soc. Exptl. Biol., 12, (1958).
- (270) G. Zubay; Science, 140, 1092 (1963).
- (271) J.R. Fresco, B.M. Alberts y P. Doty; Nature, 188, 98 (1960).
- (272) F. Cramer; Angew. Chem., 79, 653 (1967).
- (273) J.H. Lake y W.W. Beeman; Science, 156, 1371 (1967).
- (274) G. Brawerman y M. Ycas; Arch. Biochem. Biophys., 68, 112

(1957).

- (275) A.B. Pardee V.G. Shore y L.S. Prestidge; Biochim. Biophys. Acta, 27, 230 (1958).
- (276) A.N. Baldwin y P. Berg; J. Biol. Chem., 241, 839 (1966).
- (277) G. von Ehrenstein, B. Weisblum y S. Benzer; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 49, 669 (1963).
- (278) P.C. Zamecnik; Cancer Res., 26, 1 (1966).
- (279) A. Peterkofsky, C. Jesensky, A. Bank y A. H. Mehler; J. Biol. Chem., 239, 2918 (1964).
- (280) J.L. Starr; Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 181 (1963).
- (281) L. Shugart, G.D. Novelli y M.P. Stulberg; Biochim. Biophys. Acta, 157, 83 (1968).
- (282) M.P. Stulberg y K.R. Isham; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 1310 (1967).
- (283) F. Jacob y J. Monod; J. Mol. Biol., 3, 318 (1961).
- (284) F. Gros, W. Gilbert, H. Hiatt, G. Attardi, P.S. Spahr y J.D. Watson; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 111 (1961).
- (285) S. Spiegelman; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 75 (1961).
- (286) P.Y. Cheng; Biochim. Biophys. Acta, 53, 235 (1961).
- (287) H.H. Hiatt; J. Mol. Biol., 5, 217 (1962).
- (288) K. Scherrer, H. Latham y J.D. Darnell; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 49, 240 (1963).
- (289) F. Gros, S. Naono, C. Woese, G. Willson y G. Attardi; en "Informational Macromolecules" (eds. H.J. Vogel, V. Bryson y J.O. Lampen). Pg. 387. Academic Press, New York, 1963.
- (290) S. Brenner, F. Jacob y M. Meselson; Nature, 190, 576 (1961).
- (291) M.F. Singer y P. Leder; Ann. Rev. Biochem., 35, 195 (1966).
- (292) M.W. Nirenberg y J.H. Matthaei; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 1588 (1961).
- (293) D. Nathans, G. Notani, J.H. Schwartz y N.D. Zinder; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 1424 (1962).
- (294) D. Nathans; J. Mol. Biol., 13, 521 (1965).
- (295) J.H. Schwartz, J.M. Eisenstadt, G. Brawerman y N.D. Zinder; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 53, 195 (1965).
- (296) J. Marmur, R. Rownd y C.L. Schikraut; en "Progress in Nucleic Acid Research" (eds. J.N. Davidson y W.E. Cohn). Vol. I, pg. 232. Academic Press, New York, 1963.
- (297) A.P. Nygaard y B.D. Hall; J. Mol. Biol., 9, 125 (1964).
- (298) E.T. Bolton y B. J. McCarthy; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.,

- 48, 1390 (1962).
- (299) E.K.F. Batz y B.D. Hall; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 400 (1962).
- (300) A. Tissières y J.W. Hopkins; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 2015 (1961).
- (301) R.A. Cox y H.R.V. Arnstein; Biochem J., 93, 33c (1964).
- (302) H.R.V. Arnstein, R.A. Cox y J.A. Hunt; Biochem J., 92, 648 (1964).
- (303) A.R. Williamson y R.S. Schweet; J. Mol. Biol., 11, 358 (1965).
- (304) H. Bremer, M. W. Konrad, K. Gaines y G.S. Stent; J. Mol. Biol. 13, 540 (1965).
- (305) M. Grunberg-Manago y S. Ochoa; J. Am. Chem. Soc., 77, 3165 (1955).
- (306) E.P. Geiduschek y R. Hasselkorn; Ann. Rev. Biochem., 38, 647 (1969).
- (307) H. S. Slayter, J.R. Warner, A. Rich y C.E. Hall; J. Mol. Biol. 7, 652 (1963).
- (308) S.H. Barondes y M.W. Nirenberg; Science, 138, 813 (1962).
- (309) J.O. Bishop; Nature, 202, 86 (1964).
- (310) W. Gilbert; J. Mol. Biol., 6, 374 (1963).
- (311) M. Takanami y T. Okamoto; J. Mol. Biol., 7, 323 (1963).
- (312) R. Haselkorn y V.A. Fried; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 308 (1964).
- (313) G. Mangiarotti y D. Schlessinger; J. Mol. Biol., 29, 395 (1967).
- (314) M.F. Singer y P. Leder; Ann. Rev. Biochem., 35, 195 (1966).
- (315) A.C. Trakatellis M. Montjar y A.E. Axelrod; Biochemistry, 4, 1678 (1965).
- (316) P. Marks, C. Willson, J. Kruh, H.H. Hiatt y F. Gros; Biochem. Biophys. Res. Commun., 8, 9 (1962).
- (317) M. Grunberg-Manago y F. Gros; Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 1441 (1964).
- (318) M. Revel y H.H. Hiatt; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 810 (1964).
- (319) V. Lazda y J.L. Starr; J. Immunol., 95, 254 (1965).
- (320) J.L. Starr; Rheumatology, 1, 132 (1967).
- (321) A. Cozzzone y G. Marchis-Mouren; Biochemistry, 6, 3911 (1967).
- (322) J. Castles y M.F. Singer; J. Mol. Biol., 40, 1 (1969).

- (323) W. Salser, J. Janin y C. Levinthal; J. Mol. Biol., 31, 237 (1968).
- (324) R. Arlinghaus, G. Favelukes y R.S. Schweet; Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 92 (1963).
- (325) K. Moldave; Ann. Rev. Biochem., 34, 419 (1965).
- (326) R.S. Schweet y R. Heintz; Ann. Rev. Biochem., 35, 723 (1966).
- (327) J. Lucas-Lenard y F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 1050 (1967).
- (328) F. Chapeville y A.L. Haenni; Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1459 (1969).
- (329) J.M. Ravel; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 1811 (1967).
- (330) J.O. Bishop y R.S. Schweet; Biochim. Biophys. Acta, 54, 617 (1961).
- (331) J.E. Allende, R. Monro y F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 1221 (1964).
- (332) T.W. Conway y F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 52, 1462 (1964).
- (333) Y. Nishizuka y F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 55, 212 (1966).
- (334) J. Lucas-Lenard y F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 55, 1562 (1966).
- (335) A. Parmeggiani; Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 613 (1968).
- (336) Y. Kaziro y N. Inoue; J. Biochem. (Tokyo), 64, 423 (1968).
- (337) P. Leder, L. Skogerson y N.M. Nau; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 62, 454 (1969).
- (338) J. Lucas-Lenard y A.L. Haenni; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 59, 554 (1968).
- (339) J. Gordon; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 58, 1574 (1967);
ibid., 59, 179 (1968).
- (340) A.L. Haenni, J. Lucas-Lenard y J. Gordon; Fed. Proc., 27, 397 (1968).
- (341) M. Cannon, R. Krug y W. Gilbert; J. Mol. Biol., 7, 360 (1963).
- (342) H. Kaji, I. Suzuka y A. Kaji; J. Biol. Chem., 241, 1251 (1966).
- (343) S. Petska y M.W. Nirenberg; J. Mol. Biol., 21, 145 (1966).
- (344) M. Takanami y K. Miura; Biochim. Biophys. Acta, 72, 237 (1963).
- (345) C.M. Lyman; Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.,

- 5, 195 (1961) (Pub. 1962).
- (346) M. Takamami y G. Zubay; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 51, 834 (1964).
- (347) W.J. Culp, W. McKeehan y B. Hartesty; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 64, 688 (1969).
- (348) J. Gordon y F. Lipmann; J. Mol. Biol., 23, 23 (1967).
- (349) L. Skogerson y K. Moldave; J. Biol. Chem., 243, 5354 y 5361 (1968).
- (350) Y. Ono, A. Skoultchi, J. Waterson y P. Lengyel; Nature, 222, 645 (1969).
- (351) A.L. Haenni y J. Lucas-Leenard; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 61, 1363 (1968).
- (352) Y. Nishizuka y F. Lipmann; Arch. Biochem. Biophys., 116, 344 (1966).
- (353) T.L. Hill; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 64, 267 (1969).
- (354) M.I. Sherman y M.V. Simpson; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 64, 1388 (1969).
- (355) R.S. Gardner, A.J. Wahba, C. Basilio, R.S. Miller, P. Lengyel y J.F. Speyer; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48, 2087 (1962).
- (356) A.J. Wahba, R.S. Gardner, C. Basilio, R.S. Miller, J.F. Speyer y P. Lengyel; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 116 (1963).
- (357) H.G. Khorana; Fed. Proc., 24, 1473 (1965).
- (358) S. Nishimura, D.S. Jones y H.G. Khorana; J. Mol. Biol., 13, 302 (1965).
- (359) D.S. Jones, S. Hishimura y H.G. Khorana; J. Mol. Biol., 16, 454 (1966).
- (360) M. Grunberg-Manago; Ann. Pharm. Franc., 25, 147 (1967).
- (361) M.S. Bretscher y O.W. Jones en "Techniques in Protein Biosynthesis". (eds. P.N. Campbell y J.R. Sargent). Vol. I, pg. 217. Academic Press, London, 1967.
- (362) P. Leder y M.W. Nirenberg; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 420 (1964).
- (363) M.W. Nirenberg, P. Leder, M.R. Bernfield, R.L.C. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman y C. O'Neal; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 1161 (1965).
- (364) R.L.C. Brimacombe, J. Trupin, M.W. Nirenberg, P. Leder, M.R. Bernfield y T. Jacuni; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 54, 954 (1965).
- (365) D. Söll, E. Ohtsuka, D.S. Jones, R. Lohrmann, H. Hayatsu, S. Hishimura y H.G. Khorana; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 54, 1378 (1965).
- (366) D. Grunberger, I.B. Weinstein y K.B. Jacobson; Science,

- 166, 1635 (1969).
- (367) M.R. Bernfield y M.W. Nirenberg; *Science*, 147, 479 (1965).
- (368) D. Söll, D.S. Jones, E. Ohtsuka, R.D. Faulkner, R. Lohrmann, H. Hayatsu, H.G. Khorana, J.D. Cherayil, A. Hampel y R.M. Bock; *J. Mol. Biol.*, 19, 556 (1966).
- (369) F.H.C. Crick; *J. Mol. Biol.*, 19, 548 (1966).
- (370) H.M. Dintzis; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47, 247 (1961).
- (371) M.A. Naughton y H.M. Dintzis; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 1822 (1962).
- (372) P.M. Knopf y H.M. Dintzis; *Biochemistry*, 4, 1427 (1965).
- (373) J.R. Guest y C. Yanofsky; *Nature*, 210, 799 (1966).
- (374) M.A. Smith, M. Salas, W.M. Stanley, A.J. Wahba y S. Ochoa; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 55, 141 (1966).
- (375) A.L. Haenni y F. Chapeville; *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 135 (1966).
- (376) K. Marcker y F. Sanger; *J. Mol. Biol.*, 8, 835 (1964).
- (377) K. Marcker; *J. Mol. Biol.*, 14, 63 (1965).
- (378) B.F.C. Clark y K. Marcker; *Nature*, 207, 1038 (1965).
- (379) M.S. Bretscher y K. Marcker; *Nature*, 211, 380 (1966).
- (380) J. Adams y M. Capecchi; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 55, 147 (1966).
- (381) J.P. Waller; *J. Mol. Biol.*, 7, 483 (1963).
- (382) W.M. Stanley, M. Salas, A.J. Wahba y S. Ochoa; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, 290 (1966).
- (383) M. Revel, M. Herzberg, A. Becarevic y F. Gros; *J. Mol. Biol.* 33, 231 (1968).
- (384) M. Kondo, G. Eggerton, J. Eisenstadt y P. Lengyel; *Nature*, 220, 368 (1968).
- (385) M. Nomura; *Mol. Genet. Wiss. Konf. Ges. Deut. Naturforsch. Aerzte*, 4th 1967, 50. Springer-Verlag, Berlin, 1968.
- (386) A. Sarahbai, A.O.W. Stretton, S. Brenner y A. Bolle; *Nature*, 201, 13 (1964).
- (387) S. Brenner y A.O.W. Stretton; *J. Mol. Biol.*, 13, 944 (1965).
- (388) S. Brenner, A.O.W. Stretton y S. Kaplan; *Nature*, 206, 994 (1965).
- (389) M.G. Weigert y A. Garen; *J. Mol. Biol.*, 12, 448 (1965).
- (390) M.G. Weigert y A. Garen; *Nature*, 206, 992 (1965).
- (391) S. Brenner, L. Barnett, E.R. Kartz y F.H.C. Crick; *Nature*, 213, 449 (1967).
- (392) J.A. Last, W.M. Stanley, M. Salas, M.B. Hille, A.J. Wahba y S. Ochoa; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57, 1072 (1967).

- (393) A.R. Morgan, R.D. Wells y H.G. Khorana; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 56, 1899 (1966).
- (394) W. Gilbert; J. Mol. Biol., 6, 389 (1963).
- (395) M.B. Bretscher; J. Mol. Biol., 34, 131 (1968).
- (396) M. Capecchi; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58, 1144 (1967).
- (397) C.T. Caskey, R. Tompkins, E. Scolnick, T. Caryk y M. Nirenberg; Science, 162, 135 (1968).
- (398) E. Scolnick, R. Tompkins, T. Caskey y M. Nirenberg; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 61, 768 (1968).
- (399) M. Riley y A.B. Pardee; Ann. Rev. Microbiol., 16, 1 (1962).
- (400) L. Gorini y W.K. Maas; Biochim. Biophys. Acta, 25, 208 (1957).
- (401) B.N. Ames y B.J. Garry; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 45, 1453 (1959).
- (402) B.N. Ames y R.G. Martin; Ann. Rev. Biochem., 33, 235 (1964).
- (403) F. Jacob, S. Brenner y F. Cuzin; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 329 (1963).
- (404) C. Bresch; "Klassische und molekulare Genetik". Trad. españ. pg. 433. Rialp, Madrid, 1966.
- (405) A. Garen y S. Garen; J. Mol. Biol., 6, 433 (1963).
- (406) A. Garen y N. Otsuji; J. Mol. Biol., 8, 841 (1964).
- (407) J. Gallant y R. Stapleton; J. Mol. Biol., 8, 431 (1964).
- (408) H.J. Vogel y R.H. Vogel; Ann. Rev. Biochem., 36, 519 (1967).
- (409) E. Englesberg, J. Irr, J. Power y N. Lec; J. Bacteriol., 90, 946 (1965).
- (410) J. Monod; Science, 154, 475 (1966).
- (411) G.S. Stent; Proc. Roy. Soc., B, 164, 181 (1966).
- (412) A.B. Pardee y L. Prestidge; J. Bacteriol., 71, 677 (1956).
- (413) A.L. Cline y R.M. Bock; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 321 (1966).
- (414) J.R. Roth, D.N. Antón y P.E. Hartman; J. Mol. Biol., 22, 305 (1966).
- (415) B.N. Ames y P.E. Hartman; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 349 (1963).
- (416) J.R. Roth, D.F. Silbert, G.R. Fink, M.J. Voll, D.N. Antón, P.E. Hartman y B.N. Ames; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 383 (1966).
- (417) W.F. Anderson; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 62, 566 (1969).
- (418) W.F. Anderson y J.M. Gilbert; Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 456 (1969).
- (419) W.E. Knox; Brit. J. Exp. Pathol., 32 462 (1951).

- (420) O. Greengard, M.A. Smith y G. Aco; J. Biol. Chem., 238, 1548 (1963).
- (421) R.T. Schimke, E.W. Sweeney y C.M. Berlin; J. Biol. Chem., 240, 322 (1965).
- (422) H.C. Pitot y H.P. Morris; Cancer Res., 21, 1009 (1961).
- (423) Y.S. Cho, H.C. Pitot y H.P. Morris; Cancer Res., 24, 52 (1964).
- (424) H.C. Pitot y Y.S. Cho; Progr. Exp. Tumor Res., 7, 158 (1965).
- (425) H.C. Pitot; 17 Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie. Mosbach/Baden, 1966. Pg. 43. Springer-Verlag, Berlin, 1966.
- (426) M.B. Yatvin, R.W. Wannemacher y W.L. Banks; Endocrinology, 74, 878 (1964).
- (427) A.G. McGregor; en "The Thyroid Gland" (eds. R. Pitt-Rivers y W.R. Trotter). Vol. II, pg. 112. Butterworths, London, 1964.
- (428) C.T. Savin; "The Hormones: Endocrine Physiology". Little Brown 1969.
- (429) E.H. Creaser; J. Gen. Microbiol., 12, 288 (1955).
- (430) M.B. Yarmolinsky y G.L. de la Haba; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 45, 1721 (1959).
- (431) M.W. Nirenberg y J.H. Matthaei; Tr. 5 Mezhdunar Biokhim. Kongressa, Moscow, 1961, Symp. 1, 211.
- (432) R.K. Brettauer, L. Marcus, J. Chaloupka, H.O. Halvorson y R. M. Bock; Biochemistry, 2, 1079 (1963).
- (433) E.N. Bevinger; Biokhimiya, 29, 749 (1964).
- (434) D. Spencer y S.G. Wildman; Biochemistry, 3, 954 (1964).
- (435) A.J. Morris y R.S. Schweet; Biochim. Biophys. Acta, 47, 415 (1961).
- (436) A.R. Williamson y R.S. Schweet; Nature, 202, 435 (1964).
- (437) D. Nathans; Fed. Proc., Pt. 1, 23, 984 (1964).
- (438) D. W. Allen y P.C. Zamecnik; Biochim. Biophys. Acta, 55, 865 (1962).
- (439) P.C. Zamecnik; Biochem. J., 85, 257 (1962).
- (440) P.H. van Knippenberg, J.C. van Ravenswaay-Claasen, M. Grijm-Vos, H. Veldstra y L. Bosch; Biochim. Biophys. Acta, 95, 461 (1965).
- (441) J.F. Speyer, P. Lengyel y C. Basilio; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 684 (1962).
- (442) J. Davies y B.D. Davies; J. Biol. Chem., 243, 3312 (1968).
- (443) J. Davies, W. Gilbert y L. Gorini; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 883 (1964).
- (444) B.J. McCarthy, J.J. Holland y C.A. Buck; Cold Spring Harbor

Symp. Quant. Biol., 31, 683 (1966).

- (445) B. Weisblum y J. Davies; Bacteriol. Rev., 32, 493 (1968).
- (446) S. Petska, R. Marshall y M.W. Nirenberg; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 53, 639 (1965).
- (447) T.E. Likover y C.G. Kurland; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 58, 2385 (1967).
- (448) A.I. Laskin y W.M. Chan; Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 137 (1964).
- (449) J.M. Clark y A.Y. Chang; J. Biol. Chem., 240, 4734 (1965).
- (450) E.F. Gale y J.P. Folkes; Biochem. J., 53, 493 (1953).
- (451) B.G.T. Pogo y A.O. Pogo; J. Protozool., 12, 96 (1965).
- (452) M.M. Margulies; Plant Physiol., 39, 579 (1964).
- (453) R.J. Ellis; Phytochemistry; 3, 221 (1964).
- (454) A.S. Weisberger; J. Exptl. Med., 120, 161 (1964).
- (455) D.S. Fischer; Biochem. Pharmacol., 14, 971 (1965).
- (456) G.R. Julian; J. Mol. Biol., 12, 9 (1965).
- (457) J.F. Speyer, P. Lengyel, C. Basilio, A.J. Wahba, R.S. Gardner y S. Ochoa; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 559 (1963).
- (458) R. Rendi y S. Ochoa; J. Biol. Chem., 237, 3711 (1962).
- (459) A.S. Weisberger y S. Wolfe; Fed. Proc., Pt. 1, 23, 976 (1964).
- (460) D. Vázquez; Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 464 (1964).
- (461) D. Vázquez; Biochim. Biophys. Acta, 114, 277 (1966).
- (462) R.E. Monro y K.A. Marcker; J. Mol. Biol., 25, 347 (1967).
- (463) H.K. Das, A. Goldstein y L.C. Kanner; Mol. Pharmacol., 2, 158 (1966).
- (464) S. Petska; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 64, 709 (1969); Arch. Biochem. Biophys., 136, 39 (1970).
- (465) B. Colombo, L. Felicetti y C. Baglioni; Biochim. Biophys. Acta, 119, 109 (1966).
- (466) H. Yamaguchi, C. Yamamoto y N. Tanaka; J. Biochem. (Tokyo), 57, 667 (1965).
- (467) M.R. Siegel y H.D. Sisler; Biochim. Biophys. Acta, 87, 83 (1964).
- (468) H.L. Ennis y M. Lubin; Fed. Proc., Pt. 1, 23, 269 (1964).
- (469) L.L. Bennet, V.L. Ward y R.W. Brockman; Biochim. Biophys. Acta, 103, 478 (1965).
- (470) F.O. Wettstein, H. Noll y S. Penmann; Biochim. Biophys. Acta, 87, 525 (1964).

- (471) J.D. Mann; Weeds, 13, 63 (1965).
- (472) H.M. Kalckar; J. Biol. Chem., 167, 461 (1947).
- (473) E. Layne; en "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan). Vol. III, pg. 447. Academic Press. New York, 1957.
- (474) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall; J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- (475) O. Folin y V. Ciocalteu; J. Biol. Chem., 73, 627 (1927).
- (476) J.J. Kirsch, P. Siekevitz y G.E. Palade; J. Biol. Chem., 235, 1419 (1960).
- (477) A. Rothen; J. Biol. Chem., 152, 679 (1944).
- (478) M.G. Hamilton, L.F. Cavalieri y M.L. Peterman; J. Biol. Chem., 237, 1155 (1962).
- (479) M.R.V. Murthy y D.A. Rappoport; Biochim. Biophys. Acta, 95, 132 (1962).
- (480) E.B. Keller y P.C. Zamecnik; J. Biol. Chem., 221, 45 (1956).
- (481) R.S. Schweet; en "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan). Vol. V, pg. 726. Academic Press. New York, 1959.
- (482) P. Siekevitz; J. Biol. Chem., 195, 549 (1952).
- (483) P.N. Campbell y J.R. Sargent; "Techniques in Protein Biosynthesis". Vol. I, pg. 303. Academic Press, London, 1967.
- (484) S. Aronoff; "Techniques of Radiobiochemistry". 2nd. reprint. pg.56. Iowa State College Press, Ames (Iowa), 1957.
- (485) M. Satake, K. Mase, Y. Takahashi y K. Ogata; J. Biochem., (Tokyo), 56, 504 (1964).
- (486) H. Borsook, C.L. Deasy, A.J. Haagen-Smit, G. Keighley y P.H. Lowy; J. Biol. Chem., 196, 669 (1952).
- (487) E.H. Allen y R.S. Schweet; J. Biol. Chem., 237, 760 (1962).
- (488) E.H. Allen, E. Glassman, E. Cordes y R.S. Schweet; J. Biol. Chem., 235, 1068 (1960).
- (489) I.M. Glynn y J.B. Chappell; Biochem., J., 90, 147 (1964).
- (490) C.A. Dávila; J. Chromatogr., 19, 382 (1965); *ibid.*, 19, 396 (1965).
- (491) J.R. Florini, H.H. Bird y P.H. Bell; J. Biol. Chem., 241, 1019 (1966).
- (492) R.J. Mans y G.D. Novelli; Arch. Biochem. Biophys., 94, 48 (1961).
- (493) S. Shibko, P. Koiwistoinem, C.A. Tratnyek, A.R. Newhall y L. Friedman; Anal. Biochem., 19, 514 (1967).
- (494) G.H. Beaven, E.R. Holiday y E.A. Johnson; en "The Nucleic

Acids" (eds. E. Chargaff y J.N. Davidson). Vol. I, pg. 493. Academic Press, New York, 1955.

- (495) K. Burton; Biochem. J., 62, 315 (1956).
- (496) S. Moore y W.H. Stein; J. Biol. Chem., 211, 893 (1954).
- (497) S. Moore y W.H. Stein; J. Biol. Chem., 211, 907 (1954).
- (498) R. Abderhalden; Z. physiol. Chem., 252, 81 (1938).
- (499) E. von Arx y R. Neher; J. Chromatogr., 12, 329 (1963).
- (500) W.H. Stein y S. Moore; Anal. Chem., 30, 1190 (1958); D.H. Spackman; Fed. Proc., Pt. 1, 22, 244 (1963).
- (501) D.H. Spackman; Fed. Proc., Pt. 1, 23, 371 (1964).
- (502) H. Cherrey, C. Cherrey y G. Siest; Pharm. Biol., 5, 163 (1967).
- (503) B.J. Davis; Ann. Acad. Sci. N. Y., 121, 404 (1964).
- (504) A.H. Krebs y K. Henseleit; Z. physiol. Chem., 210, 33 (1932).
- (505) E.A. Cossins y S.K. Sinha; Biochem. J., 101, 542 (1966).
- (506) R.L. Blakley; Biochem. J., 61, 315 (1955).
- (507) K. Lund-Høie y D.E. Bayer; Physiol. Plantarum, 21, 196 (1968).
- (508) J. Tabone, D. Robert, S. Thomasey y N. Mamounas; Bull. Soc. Chim. Biol., 32, 529 (1950).
- (509) F.O. Green y R.N. Feinstein; Anal. Chem., 29, 1658 (1957).
- (510) A.M. Municio; Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Madrid, 1954.
- (511) J. Angulo, T. Díaz y A.M. Municio; An. Quim., 56, 317 (1960).
- (512) J. Angulo, T. Díaz y A.M. Municio; An. Quim., 57, 24 (1961).
- (513) M.A. Staab y G. Seel; Chem. Ber., 92, 1302 (1959).
- (514) R.S. Piha, R.K. Airas y L.I. Ääri; Suomen Kemistilehti, B, 39, 204 (1966).
- (515) J.S. Fruton; en "The Proteins" (ed. H. Neurath). 2nd. ed., vol. I. pg. 190. Academic Press, New York, 1963.
- (516) M. Satake, Y. Takahashi, K. Mase y K. Ogata; J. Biochem. (Tokyo), 57 184 (1965).
- (517) R.M. Campbell y H.W. Kosterlitz; J. Physiol., 106, 12P (1947).
- (518) M. Fukuda y A. Sibatani; J. Biochem., (Tokyo), 40, 95 (1953).
- (519) L.A. Elson; en "Biochemists' Handbook" (ed. C. Long). Pg. 780 E. & F.N. Spon, London, 1968.
- (520) R.A. Herret y A.J. Linck; Weeds, 9, 224 (1961).
- (521) J. Schmidt y H. Gehlen; Z. Chem., 5, 304 (1965).

(522) R.J. Block, E.L. Durrum y G. Zweig; "Paper Chromatography and Paper Electrophoresis". Academic Press, New York, 1955.

(523) L. Shuster; Ann. Rev. Biochem., 33, 571 (1964).